

**Vergleichende Untersuchungen an
Hexokinasen des Nervengewebes
von Vertebraten, Mollusken
und Insekten**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**

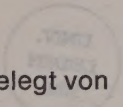
**vorgelegt von
Michael Werner**

geb. in Frankfurt a. M.

Mainz 1980

Vergleichende Untersuchungen an Hexokinasen des Nervengewebes von Vertebraten, Mollusken und Insekten

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**


**vorgelegt von
Michael Werner
geb. in Frankfurt a. M.**

Mainz 1980



1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wegener
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-H. Bäßler
- Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1980

INHALT

Einleitung

Zusammenfassung

Material und Methoden

Ergebnisse

Diese Arbeit wurde im Zoologischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Wegener durchgeführt. Ihm gilt für die Anregung zu diesen Untersuchungen und die Betreuung während der Arbeit mein besonderer Dank. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Robert Stephani für die Anfertigung der Photographien bedanken.

1. Beschreibung der Versuchstiere

2. Beschreibung der Versuchsapparatur für die Messung der Atmungsrate

3. Versuchsergebnisse

4. Diskussion der Ergebnisse und Zusammenfassung

5. Literaturverzeichnis

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Zusammenfassung und Zusammenfassung

9. Zusammenfassung

10. Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Atmungsrate

11. Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Atmungsrate

12. Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Atmungsrate

13. Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Atmungsrate

14. Zusammenfassung

15. Zusammenfassung

16. Zusammenfassung

INHALT

Abkürzungen

A Einleitung

B Material und Methoden

1. Versuchstiere
2. Chemikalien
3. Puffer für die Affinitätschromatographie
4. Präparation von ATP-Sepharose
5. Chromatographie an den ATP-Gelen
6. Polyacrylamidgelelektrophorese
7. Präparation der cytosolischen Extrakte aus Hirngewebe
8. Isolierung von Mitochondrien
9. Enzymaktivitätstests
10. Berechnung der Regressionsgraden für lineare Elutionsgradienten

C Ergebnisse

Affinitätschromatographische Untersuchungen des cytosolischen Extrakts von

1. Maushirn
2. Mausmuskel
3. Froschhirn
4. Heuschrecken- und Schneckenhirn
5. Hefe
6. Inhibition der Hexokinase im Gehirn von Maus, Frosch, Heuschrecke und Schnecke
7. Bestimmung von $V_{\max}$ Fruktose/ $V_{\max}$ Glukose der Hexokinase aus Schnecken- und Heuschreckenhirn
8. Polyacrylamidgelelektrophorese der Heuschrecken- und Schneckenhexokinase
9. Einfluß von Glukose-6-phosphat und Mg^{2+} auf die Kompartimentierung der Hexokinase

D Diskussion

E Zusammenfassung

F Literaturverzeichnis

Abkürzungen

ADP	: Adenosin-5'-diphosphat
AK	: Adenylatkinase (E C 2.7.4.3.)
AMP	: Adenosin-5'-monophosphat
ATP	: Adenosin-5'-triphosphat
2-D0G-6-P	: 2-Desoxy-D-glukose-6-phosphat
EDTA	: Äthylendiaminotetraacetat
FG	: Frischgewicht
G-6-P	: α -D-Glukose-6-phosphat
G-6-PDH	: α -D-Glukose-6-phosphatdehydrogenase (E C 1.1.1.49)
HK	: Hexokinase (E C 2.7.1.1.)
LDH	: Laktatdehydrogenase (E C 1.1.1.27)
M-6-P	: α -D-Mannose-6-phosphat
NAD(P) ⁺	: Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat), oxidiert
NAD(P)H	: Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat), reduziert
P _i	: Phosphat, anorganisch
PEP	: Phosphoenolpyruvat
PK	: Pyruvatkinase (E C 2.7.1.40)
TRAP	: Triäthanolamin-hydrochlorid-Puffer
TRIS	: Trishydroxymethyl-aminomethan-Puffer

A Einleitung

Die Hexokinase (E C 2.7.1.1.) nimmt in der Glykolyse neben der Phosphofruktokinase eine zentrale Stellung ein, darüberhinaus kann ihr Reaktionsprodukt Glukose-6-P über verschiedene Stoffwechselwege (Glykolyse, Pentosephosphatzyklus, Glykogensynthese) vom Organismus verwendet werden. Im Gehirn von Säugetieren erhält das Enzym noch dadurch eine zusätzliche Bedeutung, daß Glukose das einzige energieliefernde Substrat ist.

Bei den Untersuchungen der Säugerhirn-HK war deshalb, vor allem in den letzten Jahren, die Regulation des Enzyms von besonderem Interesse. Eine zentrale Stellung nimmt dabei das Reaktionsprodukt Glukose-6-phosphat ein, da es einerseits die Kompartimentierung der Hexokinase in der Zelle beeinflußt (s. unten) und andererseits ein potenter Inhibitor ist (Weil-Malherbe und Bone, 1951).

Bis heute ist aber noch nicht geklärt, an welcher Stelle im Enzymmolekül der Inhibitor angreift. Crane und Sols (1954) schlossen auf eine eigene regulatorische Bindungsstelle der Hirnhexokinase, weil G-6-P das Enzym im Vergleich zu Mannose-6-phosphat und 2-Desoxyglukose-6-phosphat wesentlich stärker hemmt, obwohl Mannose und 2-Desoxyglukose ebenso gute Substrate wie Glukose sind.

Die Arbeitsgruppe um Fromm dagegen leitete aus ihren kinetischen Daten ab, daß die G-6-P-Inhibition im katalytischen Zentrum abläuft (Ning et al., 1969; Purich und Fromm, 1971). Ellison et al. (1975) stellten die Hypothese auf, daß G-6-P im katalytischen Zentrum oder an eine regulatorische Stelle im Enzym bindet, die die katalytische überlappt. Casazza und Fromm (1976) zeigten, daß M-6-P die Hexokinase zwar erst in viel höheren Konzentrationen hemmt,

der Mechanismus aber dem von G-6-P gleicht. So inhibiert M-6-P gegenüber ATP kompetitiv und Mannose nicht kompetitiv, der Effekt wird durch P_i aufgehoben, und schließlich hemmt M-6-P auch die G-6-P-Bindung kompetitiv.

Wilson (1978, 1979) fand, daß G-6-P die HK des Säugerhirns vor Inaktivierung durch Glutaraldehyd, Chymotrypsin und Hitze schützt. Er leitete daraus und aus Ergebnissen von Redkar und Kenkare (1972) ab, daß das Enzym in zwei Konformationen vorliegt, die ineinander übergehen können und sich durch katalytische Aktivität, Bindung von G-6-P und P_i und die Fähigkeit, an Mitochondrienmembranen zu koppeln, unterscheiden. Er griff das Modell von Ellison et al. auf und entwickelte es weiter. Danach soll der Zuckeranteil von G-6-P von der katalytischen auf eine überlappende allosterische Bindungsstelle übertragen werden, während das Molekül mit dem Phosphatrest im katalytischen Zentrum gebunden bleibt, was die kompetitive Hemmung von G-6-P gegen ATP erklären könnte. Die Bindung an die regulatorische Stelle induziert eine Konformationsänderung, die die Hexokinaseaktivität hemmt und durch P_i reversibel ist. Mannose-6-phosphat und 2-Desoxyglukose-6-phosphat sollen diese Konformationsänderung nicht so leicht bewirken können, sie sind deshalb schwächere Inhibitoren.

Da die bisherigen kinetischen und nichtkinetischen Untersuchungen über die Regulationsmechanismen der HK zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen und Modellen führten, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, mit Hilfe der Affinitätschromatographie an immobilisiertem ATP weitere Informationen zur Aufklärung der Regulation von Säugerhirnhexokinase zu erhalten. Dazu sollte die Hexokinase an zwei verschiedene ATP-Agarose-Gele gebunden und der Einfluß von Effektoren und Substraten auf die Adsorption des Enzyms untersucht werden.

Die Arbeiten der letzten Jahre konzentrierten sich größtenteils auf die Enzyme der Säugerorgane und auf die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Nur wenige Untersuchungen über Hexokinase von Evertebraten liegen bisher vor. Die Enzyme und ihre Regulation unterscheiden sich, soweit die Ergebnisse vergleichbar sind, stark bei den einzelnen Tierstämmen. So fanden Mochizuki et al. (1977) bei dem Echinodermen *Asterias amurensis* eine Hexokinase vom MW 50 000 und mit einer starken Hemmung durch G-6-P und ATP. Dagegen zeigte das Enzym des Nematoden *Dirofilaria immitis* (Hutchison et al., 1977) keine Glukose-6-phosphat-Hemmung. Oguchi et al. (1979) beschrieben bei *Angiostrongylus cantonensis* (Nematodae) eine Glukokinase, die ebenfalls nicht durch G-6-P gehemmt wird und ein MW von ca. 60 000 Daltons hat. V. Stich (1975) zeigte für das Enzym des Flugmuskels von *Locusta migratoria* eine Inhibition durch G-6-P, die aber nicht so ausgeprägt ist wie bei den Säugerenzymen. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, wie sich die Hexokinase im Nervensystem eines niederen Wirbeltiers (*Rana temporaria*, Amphibia), eines Arthropoden (*Locusta migratoria*, Insecta) und eines Mollusken (*Helix pomatia*, Gastropoda) in ihren Eigenschaften, hauptsächlich hinsichtlich der Bindung an ATP-Agarose, von der des Säugerhirns unterscheiden und daraus Rückschlüsse auf die Regulation der Enzyme der verschiedenen Tiere (vor allem durch G-6-P) zu erhalten.

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß ein großer Teil der Säugerhexokinase (Isoenzym I und II) an Partikel gebunden vorliegt (Crane und Sols, 1953; Wilson, 1967). Kropp und Wilson (1970) und Rose und Warms (1967) zeigten, daß sie an der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert ist. Die Bindung des Hirnenzyms soll mit Hilfe eines Phospholipids erfolgen, das kürzlich gereinigt worden ist (Felqner et al., 1979).

Das Verhältnis von mitochondrial gebundener zu gelöster

Hexokinase wird durch verschiedene Metaboliten beeinflusst. So ist die Ablösung der Hexokinase spezifisch möglich durch ATP und den Inhibitor G-6-P. Diese Wirkung von G-6-P wird durch P_i aufgehoben (genauso wie die Hemmung des Enzyms) (Wilson, 1973). Die Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} führen zu einer Wiederanbindung von abgelöster Hexokinase. Auch freie Fettsäuren und verschiedene Medikamente verändern die Relation der gebundenen zur cytoplasmatischen HK (Domanska, 1978; Roth-Schechter, 1979; Hanke et al., 1979). Milde Hypoxie ließ den Anteil gebundenen Enzyms in Hirnen neugeborener Ratten ansteigen (Ignatyuk, 1977).

Da mitochondriale HK eine höhere Affinität zu ATP hat als cytoplasmatische und eine geringere Inhibition durch G-6-P zeigt (Wilson, 1967; Schwartz und Basford, 1967), scheint die reversible Bindung des Enzyms im Gehirn von Säugern eine wichtige Rolle bei der Regulation des Enzyms zu spielen, wobei die gebundene Form des Enzyms die aktive ist.

Wegener und Pfeifer (1975) fanden, daß auch bei *Rana esculenta* ein großer Teil der HK des Gehirns partikelgebunden ist, bei Insekten und *Helix pomatia* dagegen die gesamte Aktivität im cytosolischen Extrakt liegt. Es schien nun interessant festzustellen, ob die alleinige Bindungsfähigkeit bei Säugern und Amphibien eine Folge der Enzym- oder der Mitochondrieneigenschaften ist. Dazu sollte versucht werden, die Enzyme und Mitochondrien verschiedener Tiere miteinander zu koppeln.

B Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden verwandt:

- a) ausgewachsene, weiße Mäuse (*Mus musculus*)
- b) Grasfrösche (*Rana temporaria*)
- c) Weinbergschnecken (*Helix pomatia*)

Diese Tiere wurden von verschiedenen Händlern bezogen.

- d) Wanderheuschrecken (*Locusta migratoria*)

Sie entstammten einer eigenen Zucht des Institutes.

2. Chemikalien

Die benutzten Chemikalien waren Produkte der höchstmöglichen Reinheit und wurden von Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim) und Serva (Heidelberg) bezogen. Adipinsäuredihydrazid wurde von Fluka (Schweiz), CNBr-aktivierte Sepharose 4 B wurde von Pharmacia (Schweden), Agarose-N⁶-[(Aminohexyl) carbamoyl-methyl]-ATP von Sigma (USA) geliefert.

Für alle Versuche wurde doppelt destilliertes Wasser verwandt.

3. Pufferlösungen für die Affinitätschromatographie

- a) Standard-, Homogenisationspuffer, pH 7,6

10 mM Imidazol

1 mM EDTA

80 mM KCl (nur in den Experimenten mit den
Vertebraten)

0,8 mM Glukose

In diesem Puffer wurden die Gele für die Chromatographie auch äquilibriert und aufbewahrt. Er wurde für verschiedene Versuche in der Zusammensetzung verändert (s. jeweilige Versuche).

- b) Zur unspezifischen Elution sämtlicher gebundener Enzyme wurde folgender Puffer hoher Ionenstärke verwendet:

10	mM Imidazol, pH 7,6
0,1	mM EDTA
1	M KCl

- c) Die zur spezifischen Elution benutzten Puffer sind bei den betreffenden Versuchen angegeben.

4. Präparation von ATP-Sepharose

Für die Affinitätschromatographie wurden zwei verschiedene Gele verwandt:

- 1.) Agarose-N⁶-[(Aminohexyl)carbamoyl-methyl]-ATP, das von der Firma Sigma als Lyophilisat bezogen wurde. Hierbei ist die Agarose-Matrix über einen C-8-Spacer an der Aminogruppe von C⁶ des Adeninnukleotids gebunden (in der Folge als ATP-Agarose [Gel II] bezeichnet, Abb. 1b).
- 2.) Ein Gel, bei dem ATP an seinem modifizierten Ribose-rest über Adipinsäuredihydrazid an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B gekoppelt wird (Abb. 1a) (in der Folge als ATP-Sepharose [Gel I] bezeichnet). Die Anleitung für die Präparation basiert auf einer von Lamed et al. (1973) entwickelten Methode.

a) Reaktivierung der Sepharose

Die Sepharose wurde 15 min in 1 mM HCl im Becherglas gequollen und anschließend auf einer Glasfilterfritte mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Dann wurde frische HCl zugegeben und der ganze Vorgang mehrmals wiederholt (200 ml HCl/g Lyophilisat), um alle Stabilisatoren des Gels (Dextran, Laktose) auszuwaschen. 1 g

gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose ergibt ca. 3,5 ml Gelvolumen.

b) Reinigung des Spacers

Adipinsäuredihydrazid wurde zunächst mit kaltem absolutem Äthanol p.A. (ca. 150 ml/g Adipinsäuredihydrazid) auf der Glasfilterfritte gewaschen und dann in heißem Äthanol aufgelöst. Die Lösung wurde abgegossen, daraus das Präparat in kaltem Äthanol ausgefällt und im Stickstoffstrom getrocknet.

c) Ankoppeln des Spacermoleküls an die Sepharose

Adipinsäuredihydrazid wurde in 0,1 M NaHCO_3 in einer Konzentration von 50 g/l gelöst. Zu einem Volumenteil dieser Lösung wurde ein Volumen des gequollenen Gels gegeben und das Gemisch über Nacht (ca. 16 Stunden) langsam bei 4°C umgewälzt.

Nach Beendigung der Kopplung wurde pro g Sepharose mit 50 ml H_2O , 100 ml 1 M KCl, 75 ml 3,5 M KCl und nochmals 50 ml H_2O auf der Glasfilterfritte gewaschen.

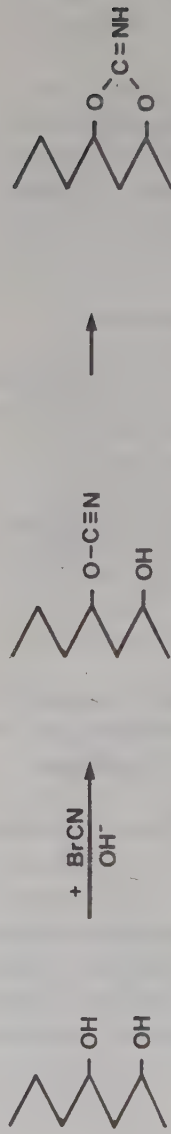
d) Oxidation des ATP mit NaJO_4

Zu einer kalten, neutralisierten 15 mM ATP-Lösung wurde die gleiche Menge 14 mM NaJO_4 -Lösung pipettiert und genau eine Stunde in der Dunkelheit bei 0°C gerührt.

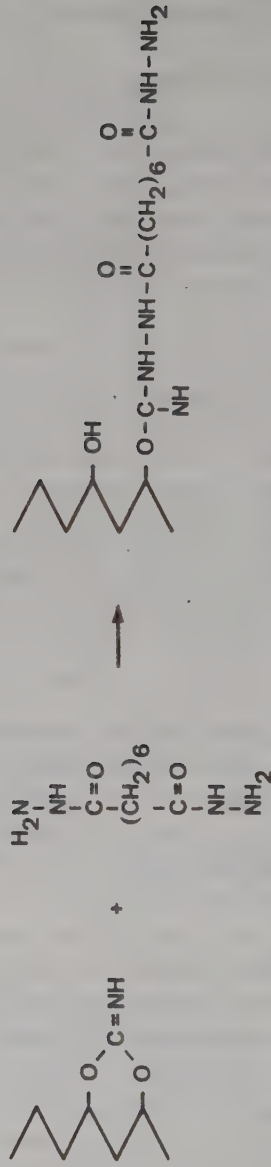
e) Ankopplung des Liganden an das Sepharose-Adipinsäuredihydrazid-Gel

Das Gel wurde im gleichen Volumen eines 0,25 M Natriumacetatpuffers, pH 5,0, aufgerührt und zu diesem Gemisch 1,4 ml des oxidierten ATP/g Sepharose gegeben, sodaß die Konzentration des Nukleotids 3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Gel betrug. Die Suspension wurde 3,5 Std. in der Kälte umgewälzt. Anschließend

Abb. 1a: Präparation der AIP-Sepharose für die Affinitätschromatographie

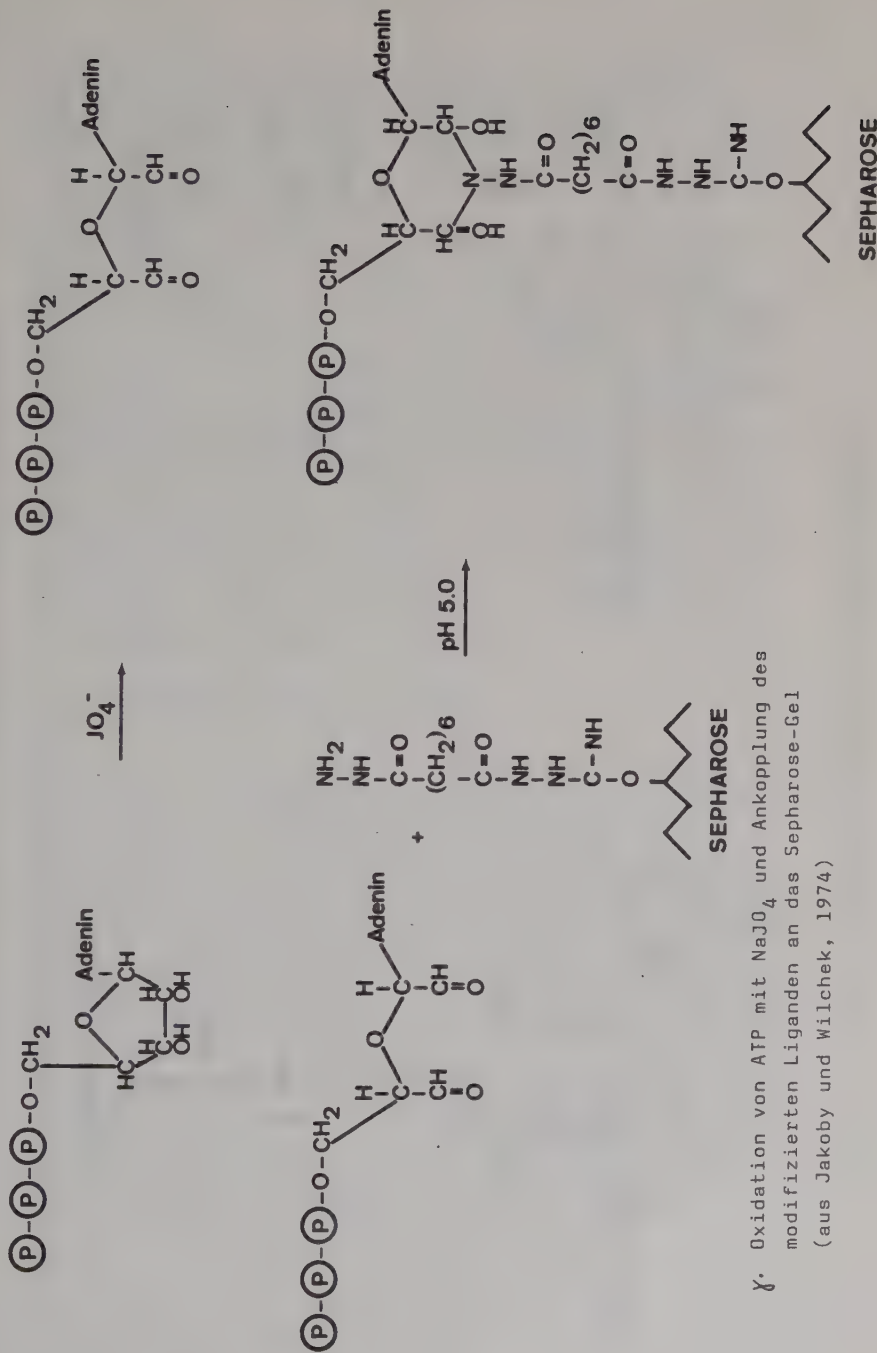


α. Bromcyanaktivierung der Sepharose (Reaktionsschema aus Bende, 1974)



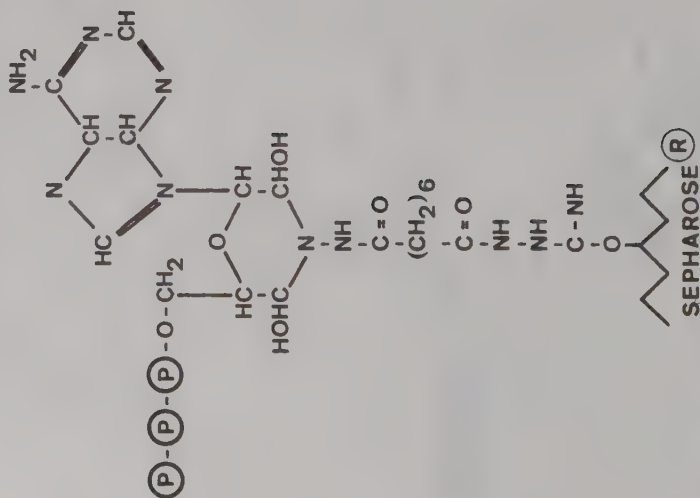
β. Bindung des Spacers Adipinsäuredihydrazid an die CNBr-aktivierte Sepharose

Abb. 1a: Präparation der ATP-Sepharose für die Affinitätschromatographie

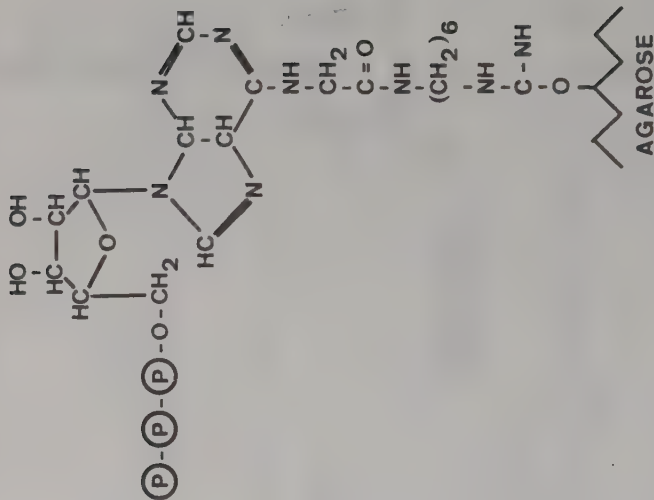


γ. Oxidation von ATP mit NaJO_4 und Ankopplung des modifizierten Liganden an das Sepharose-Gel (aus Jakoby und Wilchek, 1974)

Abb. 1b: Struktur der beiden ATP-Gele für die Affinitätschromatographie



Sepharose-C2', 3'-Adipinsäuredihydrazid -ATP



Agarose-N⁶-[(Aminoethyl)carbamoyl-methyl]-ATP

wurde mit zwei Imidazolpuffern, pH 7,6, verschiedener Ionenstärke gewaschen (10 mM Imidazol, 0,1 mM EDTA, 20 mM bzw. 1 M KCl; jeweils 60 ml Puffer/g Sepharose).

f) Nachweis der ATP-Kopplung

Die erfolgreiche Anbindung des Liganden kann über seine Absorption bei $\lambda = 259$ nm bestimmt werden. Dabei werden die Extinktionen der oxidierten ATP-Lösungen vor ($= E_1$) und nach der Kopplung ($= E_2$) und die des ersten Waschdurchganges auf der Glasfilterfritte ($= E_3$) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung miteinander verglichen. Als Maß für die erfolgte Kopplungsreaktion kann man die Größe der Differenz $E_1 - (E_2 + E_3)$ ansehen (Werner, 1977). Da aber bekannt ist, daß lösliche Mausenhirnhexokinase sehr gut an ATP-Sepharose adsorbiert wird (C. Stich, 1977; Werner, 1977), wurde die Bindung des Liganden bei neu präparierten und älteren Gelen mit cytosolischem Maushirnextrakt überprüft.

5. Chromatographie an den ATP-Gelen

Lyophilisierte ATP-Agarose von Sigma wurde 2 h in Standardpuffer quellen gelassen und dann in eine Säule von 6 x 55 mm (Volumen ca. 1,5 ml) gefüllt. Anschließend wurden mit dem gleichen Puffer die vom Hersteller zugegebenen Stabilisatoren ausgewaschen. Die selbst präparierte ATP-Sepharose wurde in Standardpuffer aufgerührt und in die Säule 6 x 55 mm (oder für die ersten Versuche 12 x 160 mm) gegeben. Dann wurde 2 Stunden mit dem gleichen Puffer äquilibriert.

Zur Äquilibrierung und für die Versuche wurden die Säulen an einen Fraktionssammler (LKB 7000 Ultrorac) angeschlossen. Die Durchflußgeschwindigkeit des Puffers betrug 0,1 ml/min (0,5 ml/min mit der großen Säule). Sie wurde mit einer peristaltischen Pumpe geregelt.

Das kleine Säulenvolumen wurde gewählt, weil in den Versuchen mit den Evertibraten nur sehr kleine Gewebemengen zur Verfügung standen und außerdem die Kapazität der Gele hoch war.

Bei der Chromatographie wurde nach dem Auftragen des Extraktes zunächst mit der gleichen Menge Homogenisationspuffers ohne Verwendung der Pumpe nachgewaschen. Vom Zeitpunkt des Auftragens an wurden Fraktionen von 0,3 ml (2 ml bei der großen Säule) gesammelt.

Die Elution der Enzyme erfolgte mit Puffern, deren Zusammensetzung in den jeweiligen Versuchen angegeben ist. Am Schluß wurde immer mit dem Puffer hoher Ionenstärke (1 M KCl) gewaschen, um die noch an das Gel gebundenen Proteine zu eluieren. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke auf 3,5 M KCl konnte keine weiteren Enzyme ablösen.

Anschließend wurde das Gel mit Standardpuffer + 0,02 % Na_3N neu äquilibriert und im Kühlschrank bei 2-4°C aufbewahrt. Während des Versuches sollten Säule und Puffer stets bei etwa 4°C gehalten werden. Beide Gele waren unter diesen Bedingungen etwa drei Monate haltbar.

6. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zum Nachweis der Hexokinaseaktivität wurde das Hilfsenzym Glukose-6-phosphatdehydrogenase, das durch die Reduktion von NADP^+ die Indikatorreaktion katalysiert, in Polyacrylamidgel einpolymerisiert. G-6-PDH bildet dabei kovalente Bindungen mit Acrylsäureresten aus. Dieses Verfahren ist notwendig, da das Hilfsenzym nicht ausreichend aus der Färbelösung in das kleinporige Gel diffundieren kann (Harrison, 1974).

Voraussetzung ist, daß die Polymerisationszeit kurz - nicht länger als 5-6 Minuten bis zur Ausbildung einer Grenzschicht Gel-Wasser - ist. Sonst wird die G-6-PDH durch Acrylamid inaktiviert.

Für die Elektrophorese (Verfahren nach V. Stich, 1975) wurde 5 %iges Trenngel ohne Sammelgel verwendet. Dazu wurden (Zusammensetzung aller Lösungen in Tab. 1) 4 Teile Trennpuffer, 1 Teil Bisacrylamid und G-6-PDH gemischt und im Exsikkator entgast. Dann wurden 2 Teile 20 %ige Acrylamid- und 1 Teil frisch angesetzte Ammoniumpersulfat-Lösung zugegeben, vorsichtig mit einem Plastikstab gerührt und sofort die Elektrophoreseröhrchen (100 x 3,5 mm) mit 1 ml des Gelgemisches gefüllt. Darüber wurden 100 µl Wasser geschichtet. Nach etwa 20 min. war die Polymerisation beendet. Die Extrakte wurden mit geeichten Mikrokapillaren (10, 20, 50 µl) durch Unterschichtung des Elektrodenpuffers aufgetragen, nachdem sie mit 1 M Saccharose beschwert worden waren. Bei einem Röhrchen wurde Bromphenolblau zugegeben, um die Lauffront zu kennzeichnen.

Die Elektrophorese erfolgte in einer Kammer mit 12 Röhrchen bei 4°C, die Stromstärke betrug 0,85 mA/Gel.

Nach 5 Stunden, als die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Die Gele wurden in der Färbelösung (Tab. 1) bei 37°C im Trockenschrank gefärbt und dann in 7 %iger Essigsäure im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese der Hexokinase

1.) Trenngelpuffer, pH 8,9 (mit 1 M TRIS eingestellt)

Barbitursäure	40 mM
EDTA	5 mM
Glukose	1,6 mM
Glutathion, reduziert	2 mM
2-Mercaptoäthanol	10 mM
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin)	0,14 %

2.) Bisacrylamidlösung 1,6 %

3.) Glukose-6-phosphatdehydrogenase [2U/ml Gel]

4.) Acrylamidlösung 20 %

5.) Ammoniumpersulfat 1,4 % (für jeden Versuch frisch angesetzt)

Für die Polymerisation werden 4 Teile Trennpuffer
1 Teil Bisacrylamid
2 Teile Acrylamid
1 Teil Ammoniumpersulfat
und die Glukose-6-phosphatdehydrogenase gemischt (s. Text)

6.) Elektrodenpuffer, pH 8,4 (mit 1 M TRIS eingestellt)

Barbitursäure	20 mM
EDTA	2,7 mM
Glukose	0,8 mM
2-Mercaptoäthanol	5 mM

7.) Färbelösung, pH 7,8 (mit 1 N HCl eingestellt)

TRIS	50 mM
NBT (p-Nitro-blautetrazoliumchlorid)	1 mg/ml Färbelösung
PMS	0,14 mg/ml Färbelösung
MgCl ₂	20 mM
NADP	1 mM
KCN	1 mM
Glukose	0,8 mM
ATP	3,0 mM

7. Präparation der cytosolischen Extrakte aus Hirngewebe

a) Maus und Frosch

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und sofort dekapitiert, die Frösche mit einer Schere im Kiefergelenk dekapitiert. Der Schädel wurde vom Hinterhauptsloch her eröffnet, das gesamte Gehirn entnommen und auf Eis gelegt.

Um die Synaptosomen zu zerstören und damit die latente Hexokinase freizusetzen, wurde das Gewebe 10 min in flüssigem Stickstoff gefroren (Werner, 1977). Nach dem Auftauen wurde es in 9 Teilen Puffer im Homogenisator nach Potter-Elvehjem der Firma Braun (Melsungen) 1 min bei 1000 Upm im Eisbad homogenisiert. Dabei wurde der Teflonstempel 10-12 Mal auf- und abbewegt.

b) Heuschrecke

Jeweils 12 Tiere wurden dekapitiert und die Stirnplatte abgetragen. Die Oberschlundganglien und die Lobi optici wurden unter dem Binokular herauspräpariert und auf Eis gelegt. Dann wurden die Gehirne in 9 Teilen Homogenisationspuffer (ohne KCl) aufgenommen und mit einem Plastikstäbchen vorsichtig extrahiert, um die cytosolischen Enzyme freizusetzen.

c) Weinbergsschnecke

Die Tiere wurden hinter dem Kopf durchgeschnitten, dieser von der Mundöffnung her in der dorsalen Mittellinie eröffnet und der Vorderdarm nach vorne aus dem Ganglienring herausgezogen. Cerebralganglien und die unter dem Pharynx zu einem Knoten konzentrierten Ganglien des Parietal- und Pedalstranges wurden zusammen entfernt und auf Eis gelegt. Weil das Gewebe sehr zäh war, erfolgte die Homogenisation nach Zugabe von 9 Teilen Standardpuffer (ohne KCl) im Ul-

traturrax der Firma Janke und Kunkel (Staufen) 4 x 15 sec. bei höchster Umdrehungszahl im Eisbad.

Die Homogenate aller Tiere wurden zunächst 10 min bei 1000 g und 2°C, der Überstand anschließend 90 min bei 33 000 g in einer Heraeus-Christ-Kühlzentrifuge Zeta 17 (Rotor Nr. 8780) zentrifugiert. Die Überstände mit den cytosolischen Enzymen wurden zur Chromatographie verwandt.

d) Hefe

15 g Bäckerhefe wurden in 15 ml Standardpuffer (ohne KCl) aufgeschwemmt und mit 30 g Glasperlen (Ø 0,4 mm) im Zellhomogenisator MSK der Firma Braun (Melsungen) unter CO₂-Kühlung aufgeschlossen. Das Homogenat wurde nach dem Auftauen 30 min bei 20 000 g in einer Christ-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert und der Überstand über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurde ein Teil des Extraktes mit 4 Volumenteilen Standardpuffer verdünnt und in einer Beckman-Ultrazentrifuge bei 2°C und 105 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Chromatographie verwandt.

8. Isolierung von Mitochondrien

Die Hirngewebe von Maus und Frosch wurden wie unter 7 a beschrieben präpariert und homogenisiert, sie wurden dazu in Saccharosemedium pH 7,3 aufgenommen:

Saccharose	250 mM
TRAP	10 mM
EDTA	5 mM
Glukose	0,8 mM
2-Mercaptoäthanol	5 mM
Glutathion	1 mM

Die Heuschreckengehirne wurden im Saccharosemedium in einem 0,5 ml-Homogenisator nach Potter-Elvehjem von Hand

homogenisiert. Dabei wurde der Teflonstempel vorsichtig 4-5 Mal auf- und abbewegt, ohne eine Drehbewegung auszuführen, um Unterdruck zu vermeiden.

Die Homogenate wurden 10 min bei 1000 g und 2°C, der Überstand 20 min mit 10 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Saccharosemedium gewaschen und dann vorsichtig resuspendiert.

9. Enzymaktivitätstests

Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte im optischen Test nach Warburg und Christian (1936). Die Extinktionsänderung wurde im Zeiss-Spektralphotometer PM 6 bei 25°C und 340 nm oder bei NADH-abhängigen Tests wegen der hohen Anfangsextinktion bei 366 nm gemessen und von einem Schreiber (Servogor) aufgezeichnet.

Die Enzymaktivitäten sind in Units [U] oder Milliunits [mU] angegeben:

1 Unit ist die Enzymaktivität, die 1 µM Substrat/min umsetzt (= Internationale Einheit)

Sie berechnet sich aus:

$$U = \frac{\Delta E \times V_G}{\min \times \epsilon \times d}$$

$$\frac{\Delta E}{\min} = \text{Extinktionsänderung/min}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient
von NADPH bzw. NADH
 $\text{cm}^2/\mu\text{MOL}$

$$V_G = \text{Testvolumen [ml]}$$

$$d = \text{Schichtdicke [cm]}$$

Die Aktivität/ml Extraktvolumen ist dann:

$$U/ml = \frac{\Delta E \times V_G}{\min \times \epsilon \times v \times d} \quad v = \text{eingesetztes Extraktvolumen [ml]}$$

und die Aktivität/g Frischgewicht:

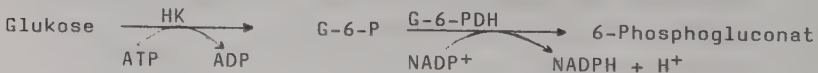
$$\frac{U}{g \text{ FG}} = \frac{\Delta E \times V_G \times F}{\min \times \epsilon \times v \times d} \quad F = \text{Verdünnung des Gewebes mit Puffer während der Extrakterstellung}$$

Aktivitätsbestimmungen

Alle Tests wurden mit $V_G = 500 \mu\text{l}$ durchgeführt. Die wäßrigen Lösungen von ATP, ADP, PEP und EDTA wurden neutralisiert.

a) Hexokinase

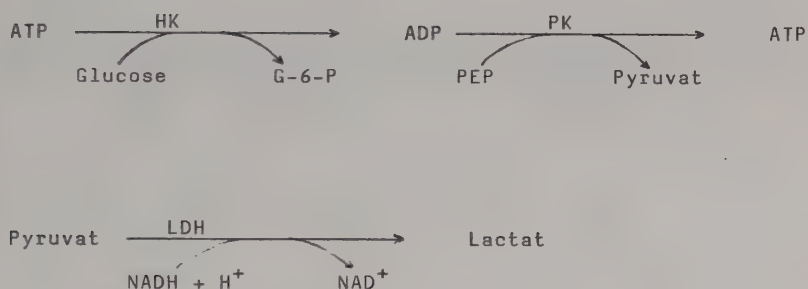
Die Aktivitätsmessung beruht auf der Reaktionsfolge:



Testansatz:

TRAP, pH 7,6	50 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	8 mM
NADP	0,5 mM
Glukose	4 mM
G-6-PDH	0,35 U/Ansatz
Extrakt	
H ₂ O	
Vorlauf	
ATP	1,5 mM

Für die Untersuchung der G-6-P-Inhibition wurde die Aktivität über eine andere Reaktionsfolge gemessen:

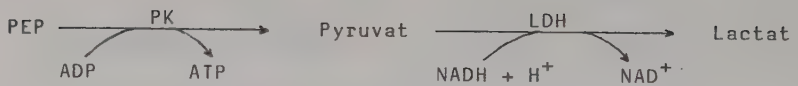


Testansatz:

TRAP, pH 7,6	50 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	8 mM
KCl	60 mM
NADH	0,2 mM
PEP	2 mM
ATP	1,5 mM
LDH	1,8 U/Ansatz
PK	1,8 U/Ansatz
Extrakt	
H ₂ O	
Vorlauf	
Glukose	4 mM

b) Pyruvatkinase

Reaktionsablauf:

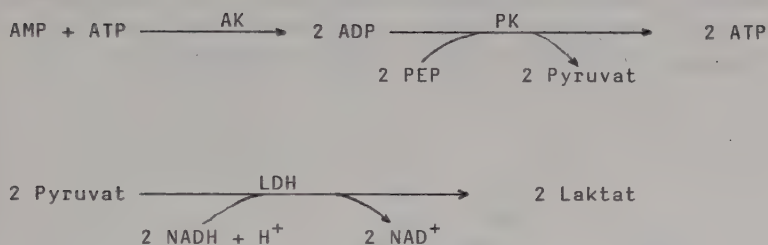


Testansatz:

TRAP, pH 7,6	100 mM
EDTA	5 mM
MgSO ₄	8 mM
KCl	60 mM
NADH	0,2 mM
PEP	1,8 U/Ansatz
LDH	1,8 U/Ansatz
Extrakt	
H ₂ O	
	Vorlauf
ADP	1 mM

c) Adenylatkinase

Testprinzip (die U sind auf den Umsatz von ATP bezogen):



Testansatz:

TRAP, pH 7,6	50 mM
EDTA	5 mM
KCl	75 mM
MgSO ₄	8 mM
NADH	0,2 mM
ATP	3 mM
PEP	1,8 mM
PK	3,2 U/Ansatz
LDH	8 U/Ansatz
Extrakt	
H ₂ O	
	Vorlauf
AMP	2,5 mM

10. Berechnung der Regressionsgeraden für lineare

Elutionsgradienten

In den Versuchen, in denen die Elution der an die Gele gebundenen Enzyme durch lineare Gradienten von ATP erfolgte, wurde aus den streuenden Meßwerten (x_i, y_i), $i = 1, \dots, n$ der Konzentrationen (von ATP) in den einzelnen Fraktionen die Regressionsgerade $y = a_1 x + b_1$ ermittelt. Ihre Konstanten a_1 und b_1 liefern die beste Annäherung der Geraden $y = ax + b$ an die Meßdaten.

Für a_1 und b_1 gelten:

$$a_1 = \frac{\sum_{i=1}^n xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n y}{n} - a_1 \frac{\sum x}{n}$$

Die Übereinstimmung der Regressionsgeraden, also der Erwartungswerte, mit den tatsächlichen Meßwerten zeigen der Korrelationskoeffizient r und das Bestimmtheitsmaß r^2 ; je näher r^2 bei 1 liegt, um so größer ist die Übereinstimmung:

$$r^2 = \frac{\left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n xy - \frac{\sum x}{n} \frac{\sum y}{n} \right]^2}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}$$

C.) Ergebnisse

1. Affinitätschromatographische Untersuchungen von ----- cytosolischem Extrakt des Maushirns -----

a) Spezifität der Bindung von Hexokinase an ATP-Sepharose-Gel

Wie bereits frühere Untersuchungen (C. Stich, 1977; Werner, 1977; Werner und Wegener, 1979) gezeigt haben, bindet Hexokinase aus Maushirn gut an ATP-Sepharose (Gel I), wenn der ternäre Komplex Enzym-Glukose-ATP gebildet werden kann, d. h. Glukose im Chromatographiepuffer vorhanden ist, Adenylatkinase wird dagegen überhaupt nicht (Abb. 2), Pyruvatkinase zu weniger als 10 % an das Gel gebunden. Diese geringe Adsorption der PK war nicht auf eine Überladung der Säule zurückzuführen, denn das gleiche Elutionsprofil ergab sich, wenn die Fraktion mit der höchsten Aktivität des Enzyms rechromatographiert wurde (Abb. 3). Die Bindung von PK und HK erfolgte nicht unspezifisch an die Matrix oder den Spacer, da bei einer Chromatographie an Sepharose-Adipinsäuredihydrazid beide Enzyme ohne Verzögerung mit Standardpuffer (s. B 3a) eluiert wurden.

b) Elution gebundener Hexokinase mit Hexose-6-phosphaten

Hexokinase, die in Standardpuffer auf das Gel aufgetragen und gebunden wurde, konnte mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 1 mM G-6-P enthielt, von Gel I (ATP-Sepharose) vollständig und von Gel II (ATP-Agarose) zum größeren Teil wieder abgelöst werden (Abb. 4 a und b).

Eine langsame Elution konnte auch mit Mannose-6-phosphat erreicht werden, einem Produkt, das das Enzym erst in wesentlich höheren Konzentrationen inhibiert als Glukose-6-phosphat (Abb. 5). 2-Desoxyglukose-6-phosphat eluiert die Hexokinase nur von Gel I, nicht dagegen von Gel II (Abb. 6).

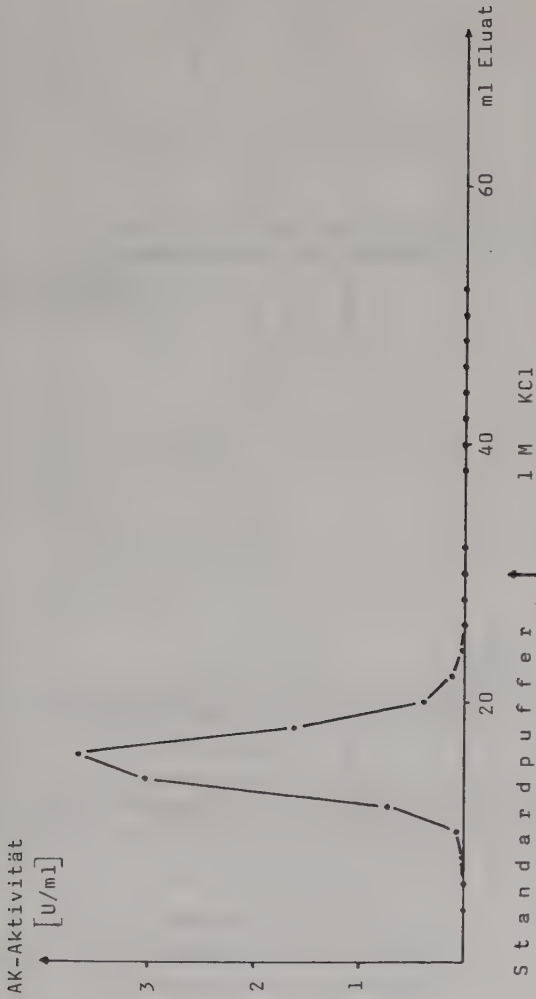


Abb. 2: Affinitätschromatographie von cytosolischem Maushirnextrakt an ATP-Sepharose (Gel I, 14 ml):
 Elutionsprofil der Adenylatkinase.
 Cytosolischer Extrakt mit einer AK-Aktivität von 18,2 U wurde auf die Säule aufgetragen und nacheinander mit Standardpuffer und Imidazolpuffer mit 1 M KCl gewaschen. Der Pufferwechsel ist durch einen Pfeil angegeben. Die Adenylatkinase wurde nicht an das Gel gebunden.

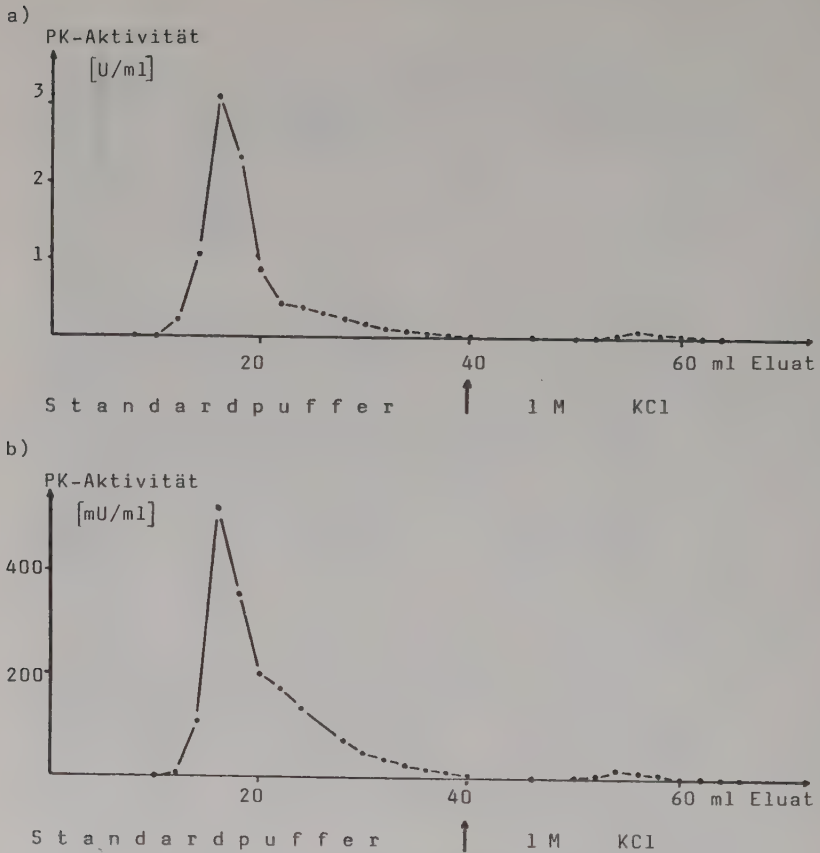


Abb. 3: Affinitätschromatographie von cytosolischem Maus-hirnextrakt an ATP-Sepharose (Gel I, 14 ml): Bindung der Pyruvatkinase.

- a) 21,4 U PK wurden auf das Gel aufgetragen und das Enzym mit Standardpuffer und Puffer mit 1 M KCl eluiert. 5 % der PK wurden an den Liganden gebunden.
- b) Von der nicht gebundenen PK wurde die Fraktion mit der höchsten Aktivität auf die gleiche Weise wie unter a) ein zweites Mal chromatographiert. Dabei wurde wieder nur ein kleiner Teil des Enzyms ($\sim 4\%$) an das Gel gebunden.

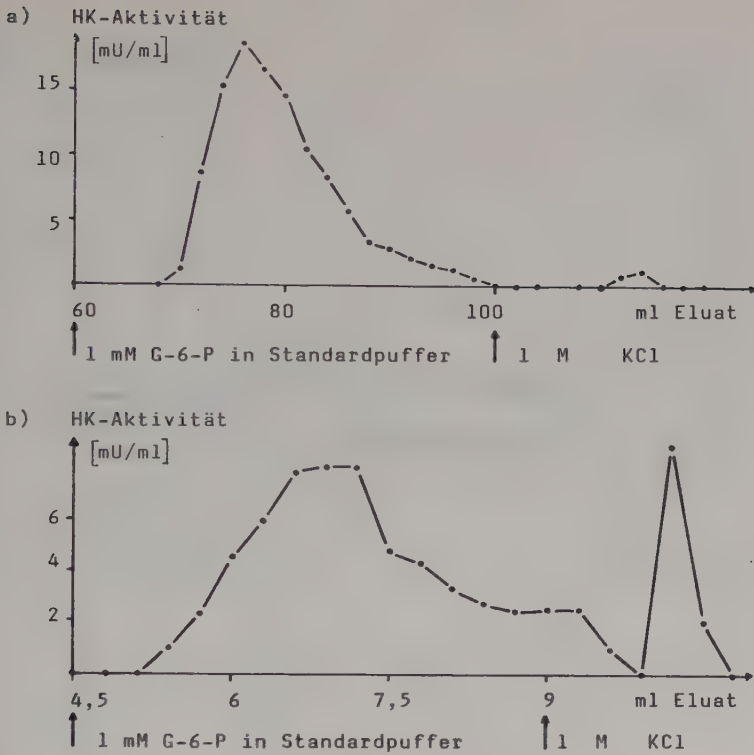


Abb. 4: Affinitätschromatographie von cytosolischem Mausehirnextrakt an ATP-Sepharose (Gel I, 14 ml) und ATP-Agarose (Gel II, 1 ml): Ablösung der Hexokinase durch Glukose-6-phosphat.

Die Elution des gebundenen Enzyms erfolgte nacheinander mit 1 mM G-6-P in Standardpuffer und mit 1 M KCl.

- a) Von ATP-Sepharose (ATP über den Riboserest an die Matrix gekoppelt) wurde die HK praktisch vollständig durch G-6-P abgelöst.
- b) Von ATP-Agarose (ATP über den Adeninring an die Matrix gebunden) wurde ein Teil der Aktivität erst durch die hohe Ionenstärke eluiert.

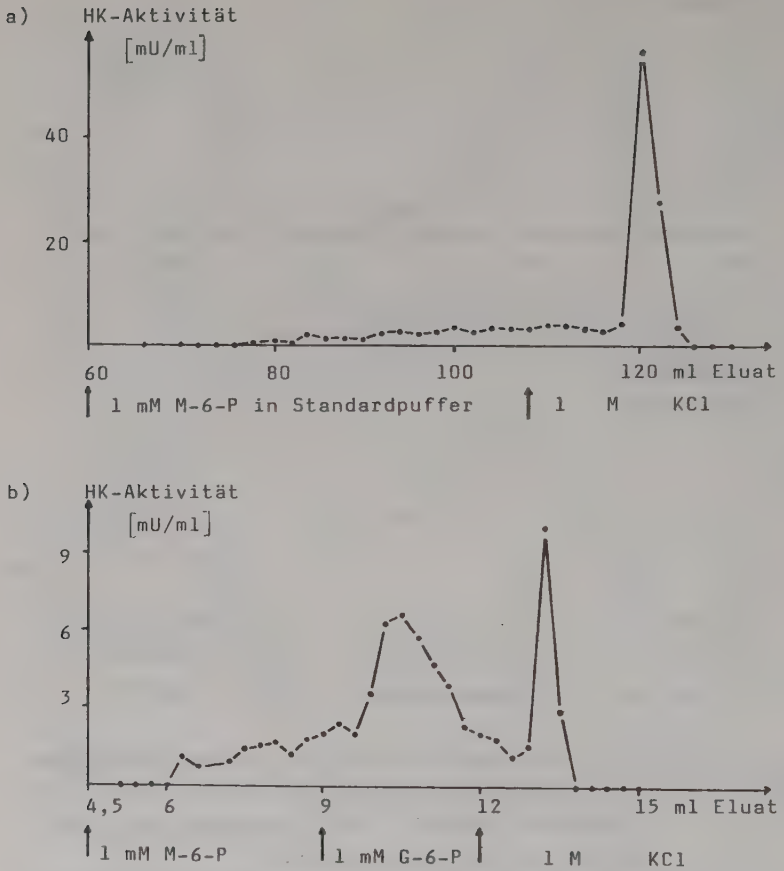


Abb. 5: Affinitätschromatographie von cytosolischem Maus-hirnextrakt an ATP-Sepharose (a) und ATP-Agarose (b):

Ablösung der Hexokinase durch Mannose-6-phosphat.

Das gebundene Enzym wurde mit 1 mM M-6-P in Standardpuffer eluiert. Durch M-6-P wurde die HK langsamer von den Gelen gelöst als mit 1 mM G-6-P (s. auch Abb. 4).

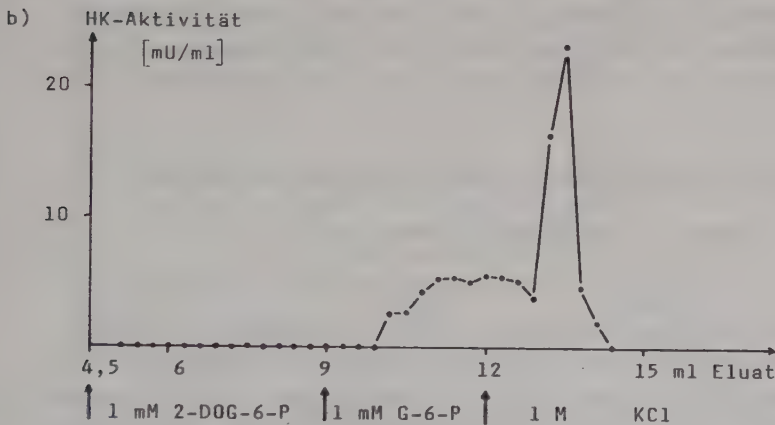
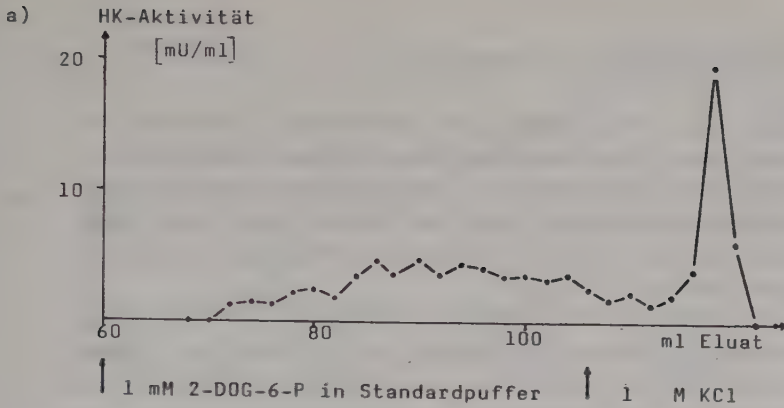


Abb. 6: Affinitätschromatographie von cytosolischem Maus-hirnextrakt an ATP-Sepharose (a) und ATP-Agarose (b):

Elution der Hexokinase durch 2-Desoxyglukose-6-phosphat.

Zur Ablösung des gebundenen Enzyms wurde die Säule mit 1 mM 2-DOG-6-P in Standardpuffer gewaschen. Von Gel I wurde ein Teil der Hexokinase, von Gel II mit 2-DOG-6-P keine Aktivität eluiert. 1 mM G-6-P löste dagegen das Enzym zum Teil vom Gel.

c) Elution des Enzyms durch ATP

Eine weitere Möglichkeit, die Hexokinase zu eluieren, bestand darin, die Konkurrenz zwischen löslichem ATP und immobilisiertem Substrat um die Nukleotidbindungsstelle am Enzym auszunutzen. Damit sollte auch noch einmal die Spezifität der Bindung von Hexokinase an den Gelen geprüft werden.

Nachdem der Extrakt aufgetragen und die Säule mit Standardpuffer gewaschen worden war, wurde mit einem ATP-Gradienten von 0-1 mM eluiert. Von ATP-Sepharose (Gel I) konnte die Hexokinase zu über 95 % gelöst werden (Abb. 7a), von Gel II waren es dagegen nur etwa 60 % (Abb. 7b), ein Ergebnis, das eine Parallele zu der unvollständigen Elution des Enzyms von Gel II durch Glukose-6-phosphat zeigt.

2. Affinitätschromatographische Untersuchungen des ----- cytosolischen Mausmuskelextraktes -----

Im Gehirn von Säugetieren liegt die Hexokinase in Form von Isoenzym I vor, im Muskel dagegen vorwiegend als Isoenzym II (Katzen, 1967). Um nachzuprüfen, ob sich die beiden Enzyme in ihren chromatographischen Eigenschaften unterscheiden, wurde der cytosolische Extrakt, der aus dem Musculus gastrocnemius gewonnen wurde, auf die beiden Gele aufgetragen. An Gel II wurde die Hexokinase vollständig gebunden, durch 1 mM G-6-P konnten etwa zwei Drittel eluiert werden, die restliche Aktivität erst durch hohe Ionenstärke (Abb. 8a). Am Sepharose-Gel I wurden nur 60 % des Enzyms adsorbiert, diese Aktivität ließ sich mit Glukose-6-phosphat vollständig ablösen (Abb. 8b).

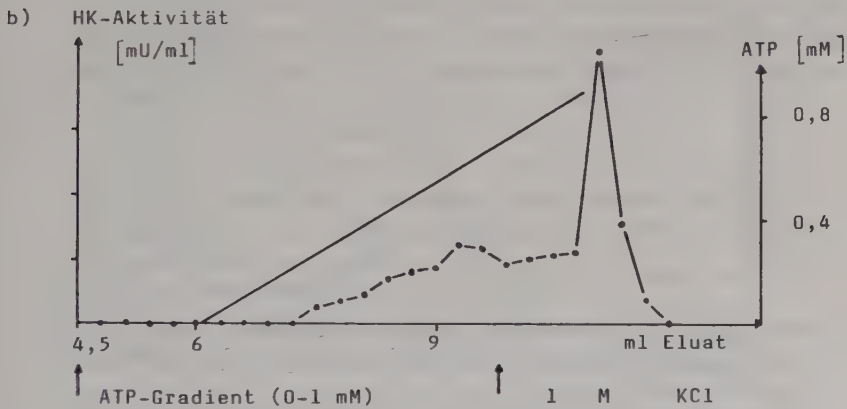
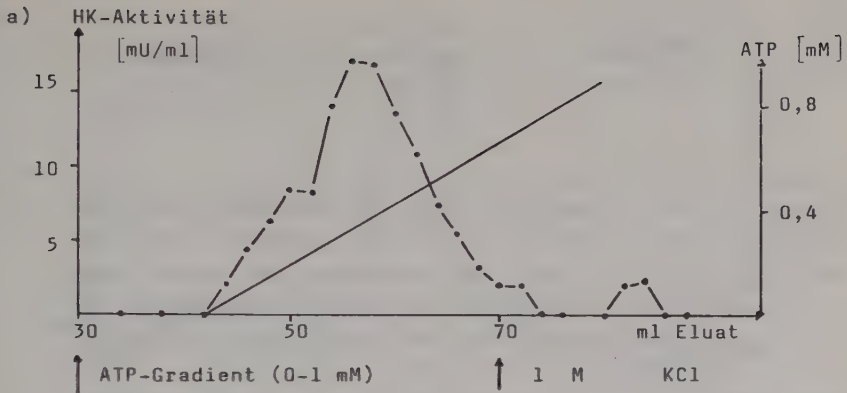


Abb. 7: Affinitätschromatographie von cytosolischem Mausehirnextrakt an ATP-Sepharose (a) und ATP-Agarose (b):

Ablösung der Hexokinase mit ATP^{4-} .

Das gebundene Enzym wurde mit einem linearen ATP-Gradienten von 0 - 1 mM eluiert.

- Über 95 % der Aktivität konnten von Gel I abgelöst werden.
- Von ATP-Agarose erfolgte die Elution durch das Substrat langsamer und weniger vollständig.

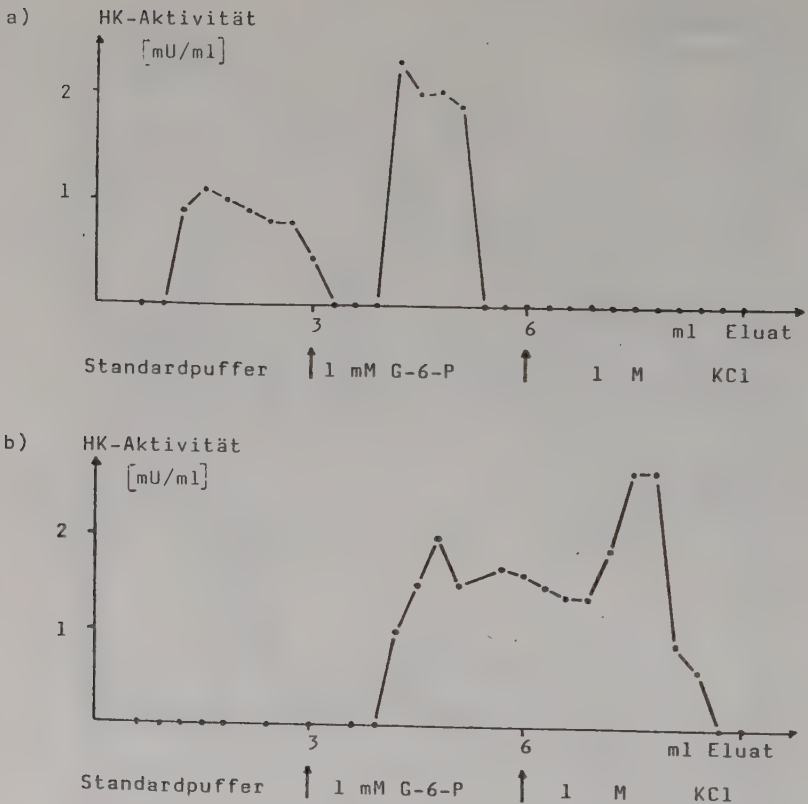


Abb. 8: Affinitätschromatographie von cytosolischem Mausmuskel-extrakt an ATP-Sepharose (a) und ATP-Agarose (b):

Bindung der Hexokinase und Elution des Enzyms durch G-6-P.

Zur Ablösung des gebundenen Enzyms wurden die Gele mit 1 mM G-6-P in Standardpuffer (3 ml) und Puffer mit 1 M KCl gewaschen.

An ATP-Sepharose (Gel I) wurden 60 % der Aktivität gebunden, dieser Anteil konnte mit G-6-P eluiert werden. Von ATP-Agarose (Gel II) dagegen wurde die HK des Muskels wie das Isoenzym I aus Hirngewebe nicht vollständig durch G-6-P (bei 3 ml Elutionsvolumen) abgelöst.

3. Affinitätschromatographische Untersuchungen an

Froschhirn

Nach den Ergebnissen der Chromatographie von Maushirnextrakt war es von Interesse zu untersuchen, ob die modifizierten ATP-Liganden die Hexokinase des Froschhirns genauso gut binden würden wie das Enzym der Maus, und ob dazu gleichfalls der ternäre Komplex Enzym-Glukose-ATP notwendig ist.

Die Ergebnisse zeigten, daß beide Gele die Hexokinase sehr gut banden (Abb. 9), während Pyruvatkinase wie bei der Maus eine viel geringere Affinität besaß. Für die Adsorption war es ohne Bedeutung, ob der Homogenisationspuffer, in dem der Extrakt aufgetragen wurde, Glukose enthielt oder nicht.

Die Elution der Hexokinase mit 1 mM G-6-P war von beiden Gelen nicht möglich. Auch durch eine Erhöhung der G-6-P-Konzentration auf 5 mM und mit M-6-P und 2-DOG-6-P gelang es nicht, das Enzym abzulösen (Abb. 9 a, b).

1 mM MgATP^{2-} genügten dagegen, die Hexokinase des Froschhirns von ATP-Sepharose und ATP-Agarose zu eluieren, und mit 1 mM ATP^{4-} , das einen etwas geringeren Effekt hatte, konnte ebenfalls ein großer Teil der Enzymaktivität abgelöst werden (Abb. 10).

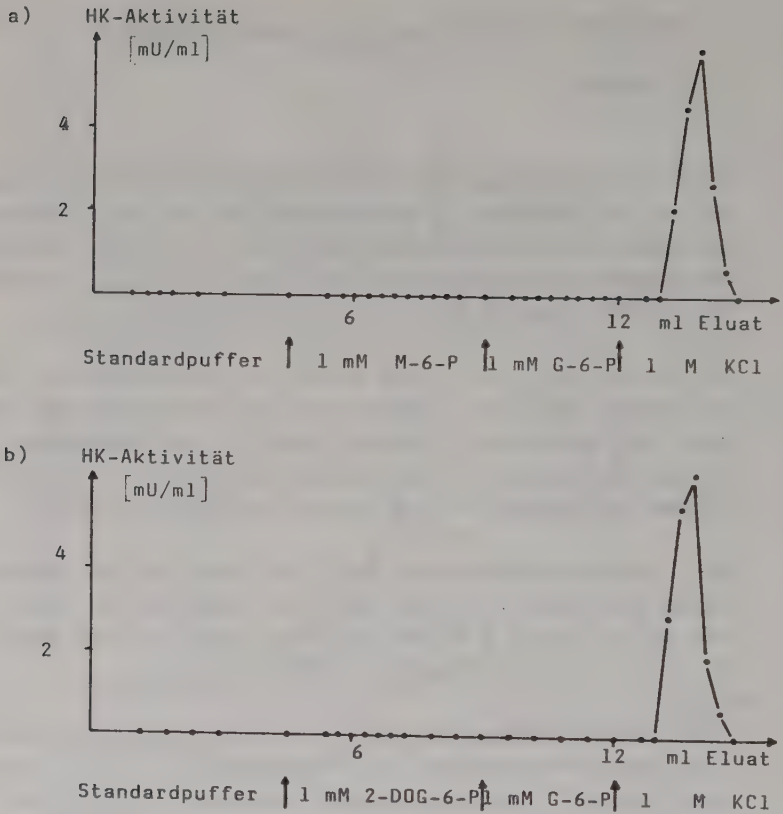


Abb. 9: Affinitätschromatographie von cytosolischem Frosch-
hirnextrakt an ATP-Sepharose:
Bindung der Hexokinase und Elution durch Hexose-
phosphate.

Das Enzym wurde vollständig an das Gel gebunden.
Es ließ sich weder durch G-6-P oder M-6-P (a),
noch durch 2-DOG-6-P (b) ablösen. Das gleiche
Ergebnis hatte die Chromatographie an ATP-Agarose
(Gel II).

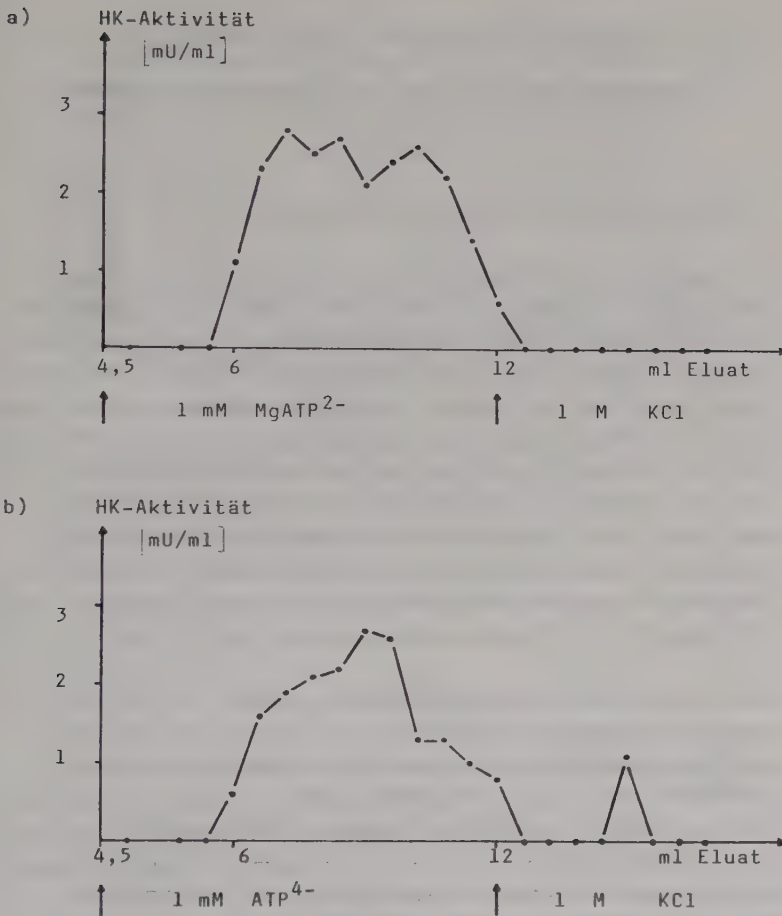


Abb. 10: Affinitätschromatographie von cytosolischem Froschhirnextrakt an ATP-Sepharose.

Die gebundene Hexokinase konnte mit 1 mM $MgATP^{2-}$ (Abb. a) vollständig, durch 1 mM ATP^{4-} (Abb. b) fast vollständig vom immobilisierten Liganden abgelöst werden.

4. Affinitätschromatographische Untersuchungen von ----- cytosolischem Heuschrecken- und Schneckenhirnextrakt -----

a) Affinität der Hexokinase zum Liganden ATP

Die Hexokinasen aus dem Nervensystem von *Locusta migratoria* und *Helix pomatia* besitzen sehr ähnliche Eigenschaften. Auf beiden Gelen wurden die Enzyme in zwei Fraktionen eluiert, von denen eine mit Homogenisationspuffer von der Säule gewaschen, die andere an die Gele gebunden wurde (Abb. 11 a und 12). Die Enzyme der beiden Tiere unterscheiden sich dadurch, daß die Hexokinase der Schnecke zu einem geringeren Teil gebunden wurde als die der Heuschrecke. Es war aber auch in der Affinität zu den beiden Gelen eine Differenz zu beobachten, da die Bindungsfähigkeit von Gel I, bei dem ATP über den Riboserest an die Matrix gekoppelt ist, für Schnecke und Heuschrecke etwas höher war (Tab. 2).

Die Präparation des cytosolischen Extraktes und das Auftragen der Proben auf die Gele wurde im Homogenisationspuffer durchgeführt, der kein KCl enthielt wie in den Experimenten mit den Vertebraten; nach der Zugabe von 80 mM KCl war nämlich eine starke Reduktion der Bindung von Heuschreckenhexokinase an Gel II zu beobachten. Dagegen hatten 0,3 M Saccharose und eine Veränderung des pH-Wertes auf 7,3 - dieses Medium wurde zur Isolierung der Mitochondrien verwendet - keinen Einfluß auf die Adsorption des Enzyms.

Um auszuschließen, daß die Auftrennung der Aktivitäten in zwei Peaks auf die Überladung der Gele zurückzuführen war, wurde nur die Hälfte des Extraktes aufgetragen: das Verhältnis der Aktivitäten beider Peaks änderte sich dadurch nicht.

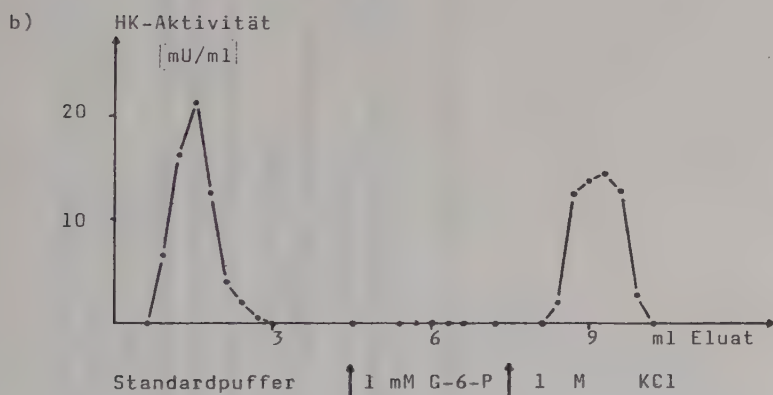
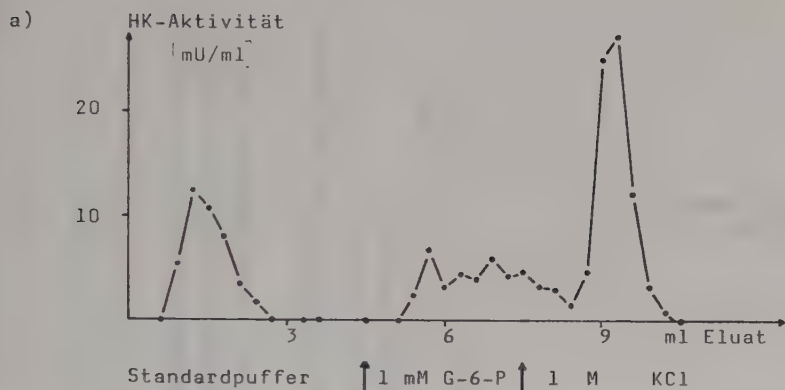


Abb. 11: Affinitätschromatographie von cytosolischem Heuschreckenhirnextrakt an ATP-Sepharose (a) und ATP-Agarose (b):
Bindung und Elution der Hexokinase.

Die HK-Aktivität wurde in zwei Fraktionen eluiert, von denen eine an das Gel gebunden wurde. Dieses Enzym konnte durch 1 mM G-6-P nur von Gel I und hier nur zum Teil abgelöst werden.

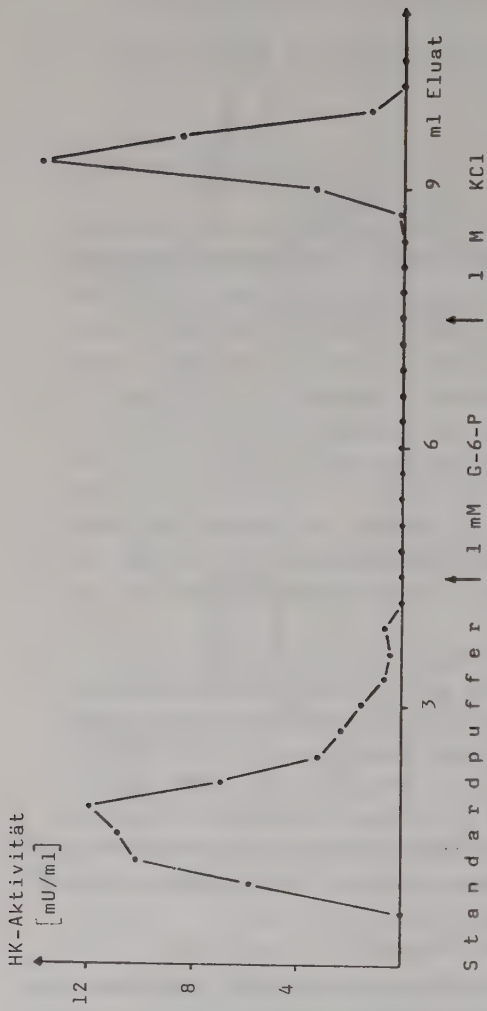


Abb. 12: Affinitätschromatographie von cytosolischem Schneckenhirnextrakt an ATP-Agarose: Bindung und Elution der Hexokinase.

Wie bei der Heuschrecke wurde nur ein Teil der auf das Gel aufgetragenen HK gebunden. Diese Aktivität ließ sich durch 1 M KCl, dagegen nicht spezifisch mit 1 mM G-6-P ablösen. Die Chromatographie an ATP-Sepharose (Gel I) hatte das gleiche Ergebnis.

Tabelle 2 Bindung der Hexokinase aus Heuschrecken- und Schneckenhirn an die Affinitätsgele I und II. Die Säulen wurden nicht bis zur Kapazitätsgrenze beladen.
Die angegebenen Werte bedeuten % der aufgetragenen Aktivität (Mittelwerte aus 3-6 Versuchen $\pm$ Standardabweichung).

	Gel I (ATP-Sepharose) Kopplung des Liganden an die Matrix über den Riboserest	Gel II (ATP-Agarose) Kopplung des Liganden über den Adeninring
Heuschrecke	72 $\pm$ 6	50 $\pm$ 7
Schnecke	45 $\pm$ 6	36 $\pm$ 2

Der K_M -Wert für Glukose liegt bei den meisten bisher untersuchten Isoenzymen der Hexokinase von Evertetraten höher als bei den Enzymen des Maushirns. Deshalb wurde versucht, durch Erhöhung der Glukose-Konzentration im Puffer auf das 10-fache (= 8 mM) die Anbindung von Schnecken- und Heuschreckenhexokinase an die Gele zu verbessern, was aber nicht gelang.

In zwei Versuchen mit Heuschrecken-HK an ATP-Agarose wurde Glukose durch 0,8 mM Fruktose bzw. Mannose im Puffer ersetzt. Die Affinität der Hexokinase wurde davon ebenfalls nicht beeinflusst.

Es zeigte sich schließlich, daß die Enzyme der beiden Evertetraten wie das des Froschhirns gleich gut auch dann banden, wenn kein Zucker in den Puffer gegeben wurde.

Im Gegensatz zur HK und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei Maus und Frosch wurde die Pyruvatkinase von Schnecken- und Heuschreckenganglien nur zu einem geringen Teil (stets < 10 %) adsorbiert (Abb. 13).

b) Variation der Elutionsbedingungen

Da die Hexokinase der beiden Evertetraten wie die der Vertebraten durch 1 mM G-6-P zu über 90 % gehemmt wird (s. C 7), wurde zunächst versucht, mit 1 mM G-6-P eine Elution des gebundenen Hexokinaseanteils zu erreichen. Dies war bei dem Schneckenhirnenzym nicht möglich, die Hexokinase von *Locusta* wurde nur von ATP-Sepharose (Gel I) und auch nur zum Teil abgelöst (Abb. 11 und 12).

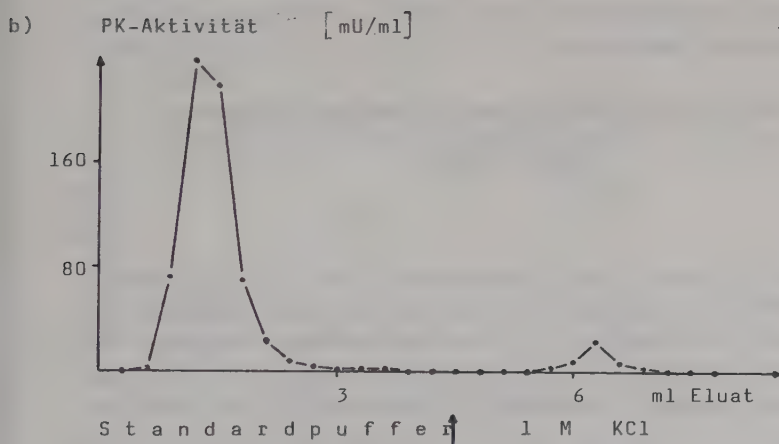
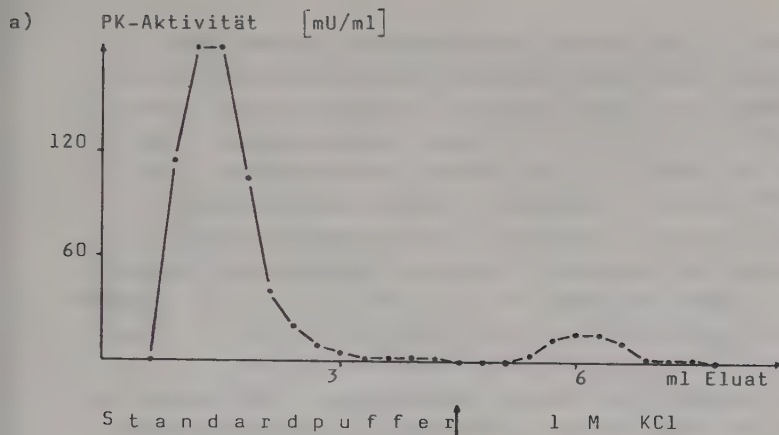


Abb. 13: Affinitätschromatographie von cytosolischem Ex-
trakt aus
a) Heuschrecken- und b) Schneckenhirn
an ATP-Agarose: Elutionskurve der Pyruvatkinase.
Nur ein geringer Teil der PK der beiden Tiere
wurde an das Gel gebunden. Die Chromatographie
an ATP-Sepharose zeigte das gleiche Ergebnis.

Durch 1 M KCl wurden die Hexokinasen dagegen sofort eluiert. Eine Möglichkeit, die Hexokinase spezifisch vom Liganden abzulösen, schien die Elution mit ATP^{4-} oder MgATP^{2-} , die bei den Vertebraten einen starken Effekt auf die Bindung gezeigt hatten. Doch weder mit 1 mM ATP^{4-} noch mit 1 mM MgATP^{2-} konnten mehr als 10-15 % der Hexokinase von Schnecke und Heuschrecke gelöst werden. Auch durch Mg^{2+} , das beim Maushirn eine Bindung des Enzyms verhindert (Werner, 1977), wurde kein größerer Anteil an Aktivität eluiert (Abb. 14 und 15).

Der Verdacht, daß es sich im Gegensatz zu den beiden Vertebraten um eine unspezifische Bindung handelte, bestätigte sich nicht. Bei einem Kontrollversuch mit Heuschrecken-HK wurde praktisch kein Enzym an Adipinsäuredihydrazid-Sepharose adsorbiert.

5. Affinitätschromatographische Untersuchungen von ----- Hefehexokinase -----

Hefe-HK wurde in der Vergangenheit sehr intensiv untersucht. Sie unterscheidet sich von den Säugerenzymen u.a. im Molekulargewicht, K_M -Werte der Substrate, Hemmung durch G-6-P. Es konnte auch gezeigt werden (Werner, 1977), daß Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* an ATP-Sepharose nicht fest gebunden, ein Teil der Aktivität aber verzögert von der Säule gewaschen wird. Diese Fraktion enthält vorwiegend Isoenzym P I, die erste, nicht verzögerte, dagegen P II.

Im Vergleich zu den tierischen Hexokinasen wurde nun die Bindung des Hefeenzym an ATP-Agarose (Gel II) untersucht, zumal Lindberg und Mosbach (1975) festgestellt hatten, daß N^6 - [(6-Aminohexyl)carbamoyl methyl] -ATP, der Ligand von Gel II, ein gutes Substrat der Hefehexokinase ist.

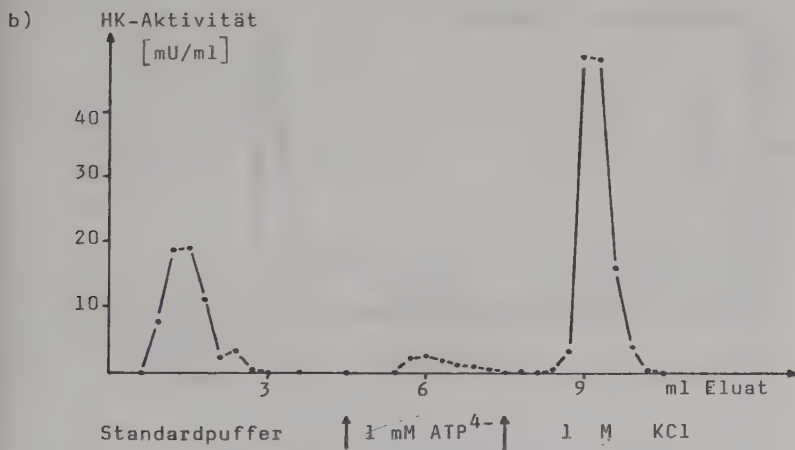
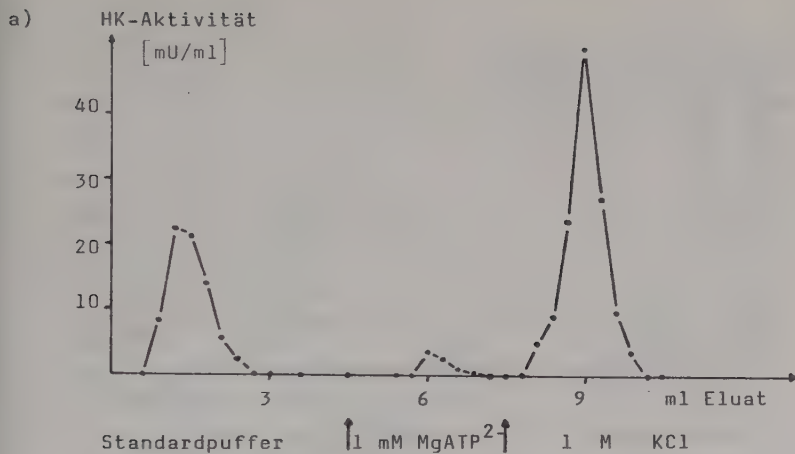


Abb. 14: Affinitätschromatographie von cytosolischem Heuschreckenhirnextrakt an ATP-Sepharose.

Mit 1 mM MgATP²⁻ (Abb. a) und 1 mM ATP⁴⁻ (Abb. b) in Standardpuffer konnten weniger als 10 % der gebundenen Hexokinase eluiert werden.

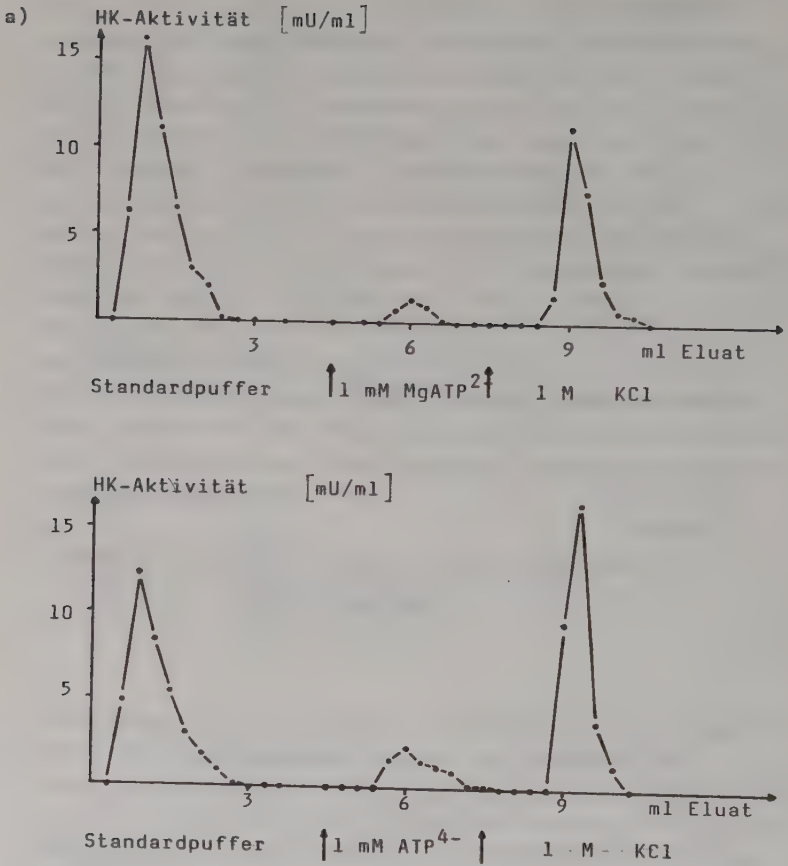


Abb. 15: Affinitätschromatographie von cytosolischem Schneckenhirnextrakt an ATP-Sepharose.

Durch 1 mM $MgATP^{2-}$ (Abb. a) und 1 mM ATP^{4-} (Abb. b) in Standardpuffer wurden weniger als 10 % der gebundenen Hexokinase vom Gel abgelöst.

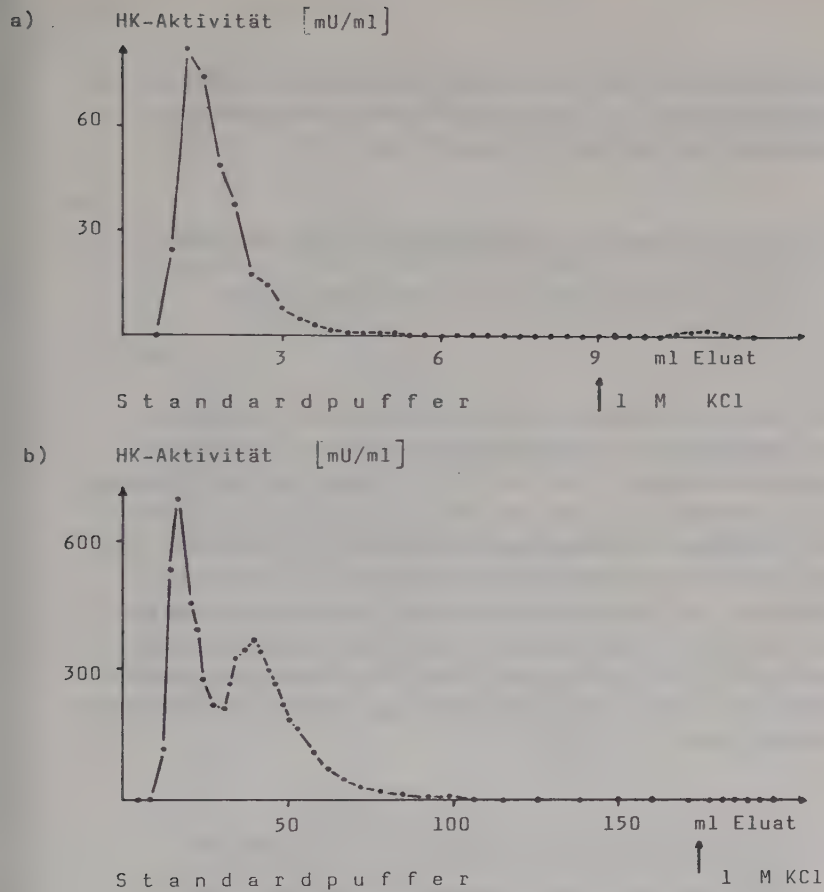


Abb. 16: Affinitätschromatographie von cytosolischem Hefeextrakt an ATP-Agarose (Gel II) (Abb. a):
Elutionskurve der Hexokinase.

Cytosol mit einer HK-Aktivität von 97,3 mU wurde auf das Gel aufgetragen und dann nacheinander mit Standardpuffer und Puffer mit 1M KCl gewaschen. 99 % der Enzymaktivität wurden mit Standardpuffer eluiert. Im Vergleich dazu ist die Elution der Hefehexokinase von Gel I gezeigt (aus Werner, 1977) (Abb. b).

Es zeigte sich, daß der Ligand die Hexokinase nicht zu binden vermochte, es wurde auch keine Auftrennung der Isoenzyme wie bei Gel I erreicht (Abb. 16).

6. Inhibition der Hexokinase aus dem Gehirn von Maus,

Frosch, Heuschrecke und Schnecke durch G-6-P

Bei den affinitätschromatographischen Untersuchungen an Hexokinasen aus Hirngeweben hatte sich lediglich das Säugerenzym durch 1 mM G-6-P vollständig bzw. zum größten Teil von den Gelen eluieren lassen. G-6-P ist ein potenter Inhibitor der Hexokinase im Gehirn der Mammalia. Im Gegensatz zu dem fehlenden Effekt auf die Bindung des Enzyms an den Liganden hatte G-6-P auch bei den anderen Species eine stark hemmende Wirkung auf die Hexokinaseaktivität. Sie war bei den Schnecken am wenigsten ausgeprägt, aber bei 1 mM G-6-P waren alle Enzyme zu über 90 % gehemmt (Abb. 17 a-d, Tab. 3).

7. Kinetische Charakterisierung der Hexokinase aus

Schnecken- und Heuschreckenhirn: Bestimmung von

($V_{\max}$ Fruktose) : ($V_{\max}$ Glukose)

Durch die Affinitätschromatographie hatte sich die Hexokinaseaktivität im Gehirn von Heuschrecken und Weinbergschnecken in zwei Fraktionen auftrennen lassen. Es sollte nun geprüft werden, ob es sich dabei um Isoenzyme handelt.

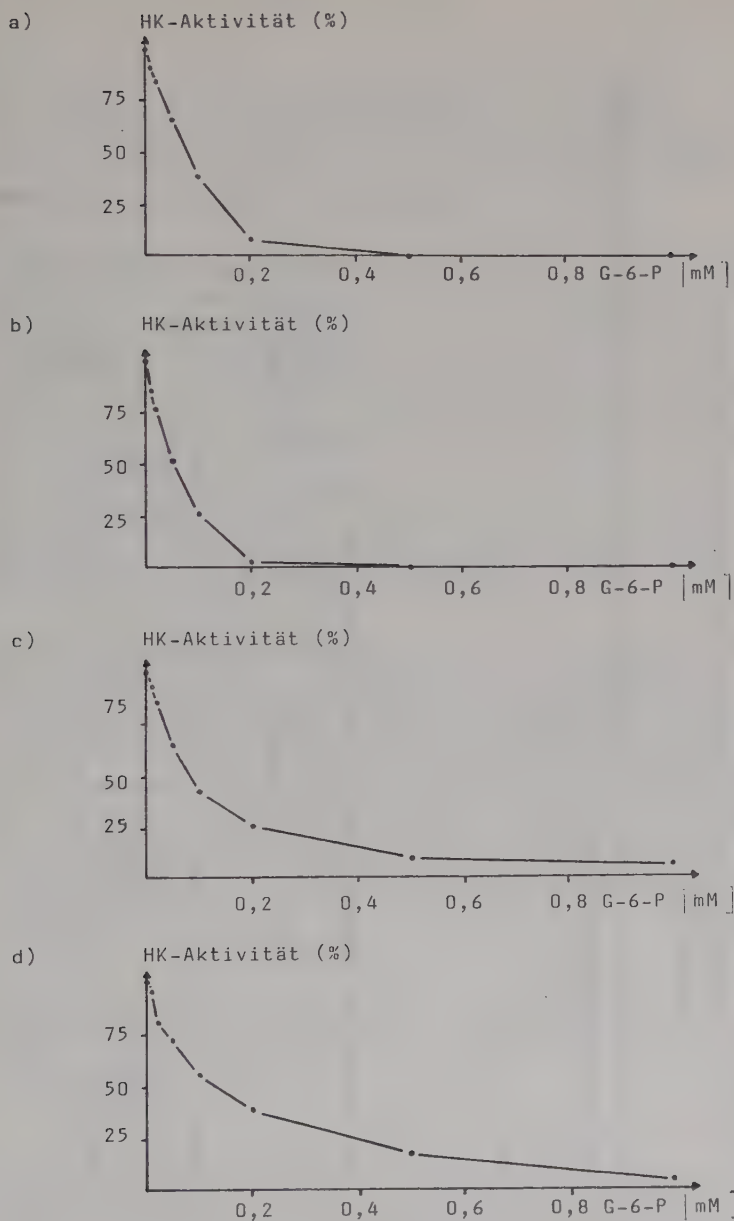


Abb. 17 a) - b): Inhibition der Hexokinase aus dem Gehirn von Maus (a), Frosch (b), Heuschrecke (c) und Schnecke (d) durch G-6-P (s. Tab. 4).

Tabelle 3 Inhibition der Hexokinase aus dem Gehirn von Maus, Frosch Heuschrecke und Weinbergschnecke durch Glukose-6-phosphat
(s. auch Abb. 17 a-d)

Die Hemmung des cytosolischen Extraktes der Tiere wurde mit folgenden Konzentrationen von Glukose-6-phosphat untersucht:

10^{-5} M ; 2×10^{-5} M ; 5×10^{-5} M
 10^{-4} M ; 2×10^{-4} M ; 5×10^{-4} M
 10^{-3} M ;
 10^{-2} M .

Die Hexokinasen wurden zu über 50 bzw. 90 % gehemmt durch:

Tier	[G-6-P] 90 % Hemmung	[G-6-P] 50 % Hemmung
Maus	0,2 mM	0,1 mM
Frosch	0,2 mM	0,05 mM
Heuschrecke	0,5 mM	0,1 mM
Schnecke	1,0 mM	0,2 mM

Das Verhältnis der $V_{\max}$ der Hexokinase für die beiden Substrate Fruktose und Glukose ist eine Möglichkeit Isoenzyme zu unterscheiden, wie es für P I und P II der Hefe gezeigt wurde (Colowick, 1973).

Nach der Chromatographie von Schnecken- und Heuschreckenhirnextrakt an ATP-Agarose wurden die Fraktionen, die die meiste Hexokinase enthielten, zusammengegeben. Dann wurden die Aktivitäten des Enzyms mit verschiedenen Glukose- und Fruktosekonzentrationen (bis 200 mM) bestimmt und $(V_{\max}^{\text{Fruktose}}) : (V_{\max}^{\text{Glukose}})$ berechnet (Tab. 4).

Bei beiden Tieren ließ sich zeigen, daß der Quotient bei der ersten Fraktion (nicht gebundene Hexokinase) stets größer war als bei der zweiten, die Werte für den cytosolischen Extrakt lagen immer in der Mitte.

Die Möglichkeit, daß es sich bei einer der Fraktionen der Chromatographie um eine Modifikation des Enzyms durch Proteasen handelte, konnte ausgeschlossen werden. Der Überstand eines frischen Homogenats, das 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert worden war, hatte den gleichen Quotienten $(V_{\max}^{\text{Fruktose}}) : (V_{\max}^{\text{Glukose}})$ wie der cytosolische Extrakt. Dieser änderte sich nicht, wenn das Enzym vier Stunden im Eisbad stehen gelassen wurde.

8. Polyacrylamidgelelektrophorese der Heuschrecken- und ----- Schneckenhirnhexokinase -----

Die kinetischen Unterschiede der beiden HK-Fractionen aus der Affinitätschromatographie von Schnecken- und Heuschreckenhirn deuteten daraufhin, daß im Gehirn der beiden Tiere

Tabelle 4 Kinetische Charakterisierung der Hexokinase aus Heuschrecken- und Schneckenhirn
Cytosolischer Extrakt der Gehirne wurde auf ATP-Agarose chromatographiert und ($V_{\max}$ Fruktose) : ($V_{\max}$ Glukose) bestimmt für:

- a) das Cytosol
- b) die Fraktion des Enzyms, die mit Homogenisationspuffer eluiert wurde (Fraktion I)
- c) die Hexokinase, die an das Gel gebunden wurde (Fraktion II)

Der Quotient war für Fraktion I < Cytosol < Fraktion II

	Schnecke		Heuschrecke	
	$\frac{V_{\max}}{V_{\max}}$	$\frac{\text{Fruktose}}{\text{Glukose}}$	$\frac{V_{\max}}{V_{\max}}$	$\frac{\text{Fruktose}}{\text{Glukose}}$
cytosolischer Extrakt	1,3 ±	0,14	1,25 ±	0,01
Fraktion I	1,57 ±	0,17	1,92 ±	0,09
Fraktion II	0,94 ±	0,12	1,09 ±	0,16

Isoenzyme vorkommen. Mit Hilfe von Stärke- und Polyacrylamidgelelektrophorese ist die Existenz von Isoenzymen für mehrere Insekten bereits nachgewiesen worden (Cheng und Hacker, 1979; Tabachnick, 1978; Yanagawa, 1978). Es sollte deshalb versucht werden, die beiden Fraktionen der Chromatographie an ATP-Agarose elektrophoretisch zu differenzieren. Dazu wurden verschiedene Probemengen beider Fraktionen und des cytosolischen Extraktes auf Polyacrylamidgele aufgetragen.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 18 und 19 dargestellt. Die Hexokinase des Schneckenhirncytosols läßt sich in drei Banden auftrennen, das Cytosol der Heuschrecke zeigt zwei nicht sicher voneinander getrennte Banden mit einer Laufstrecke s von 6 bzw. 10 mm. Fraktion I der Chromatographie bei den Insekten entspricht einem Enzym mit einer Laufstrecke von 10,5 mm, Fraktion II einer Aktivität, die deutlich näher an der Kathode liegt ($s = 7$ mm). Die drei Banden der Schneckenhirn-HK, die sich nach der Elektrophorese des cytosolischen Extraktes färben ($s = 2,5$; 9; 14 mm) sind auch bei den Fraktionen des ersten Peaks zu beobachten ($s = 2,5$; 8; 13,5 mm). Die Hexokinase, die an den Liganden gebunden wurde, lief dagegen nur in einer Bande ($s = 9,5$ mm).

In einigen Versuchen färbte sich das Gel an der Auftragsstelle, was vermutlich auf Enzym, das nicht in das Polyacrylamid diffundierte, zurückzuführen ist.

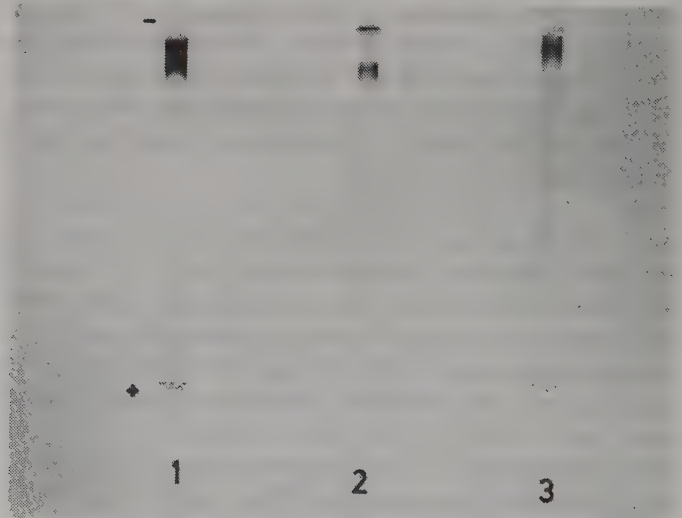


Abb. 18: Polyacrylamidgelelektrophorese der Hexokinase aus Heuschreckenhirn; Vergleich von cytosolischem Extrakt und den Fraktionen aus der Affinitätschromatographie an ATP-Agarose:

- 1.) 8,28 mU - Cytosol
- 2.) 1,84 mU - Fraktion I (nicht an den Liganden gebundene Aktivität)
- 3.) 0,92 mU - Fraktion II (gebundene HK)

Das Cytosol zeigt zwei nicht sicher getrennte Aktivitätsbanden, die beiden Fraktion aus der Chromatographie jeweils eine. Die HK aus Fraktion I wanderte dabei weiter zur Anode als das gebundene Enzym.

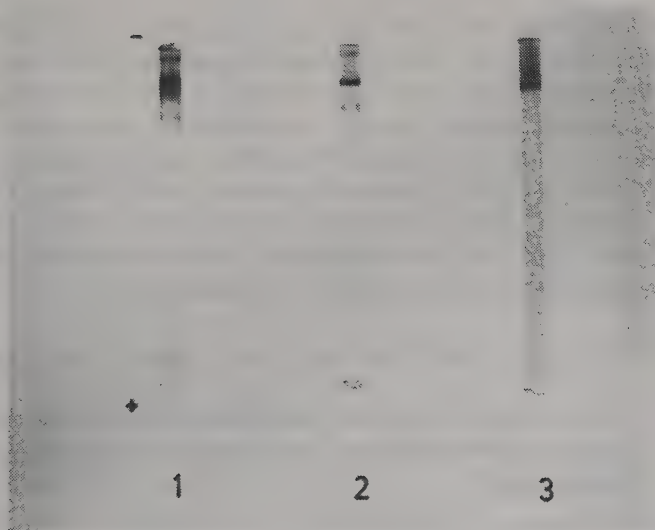


Abb. 19: Polyacrylamidgel elektrophorese von Schneckenhirn-HK;
Vergleich von cytosolischem Extrakt mit den Frak-
tionen aus der Affinitätschromatographie an ATP-
Agarose:

- 1.) 18,80 mU - Cytosol
- 2.) 1,63 mU - Fraktion I (nicht gebundene HK)
- 3.) 0,26 mU - Fraktion II

Die Hexokinaseaktivitäten des Cytosols und der
Fraktion I färbten drei Banden, das gebundene Enzym
der zweiten Fraktion nur eine breitere.

9. Einfluß von G-6-P und Mg^{2+} auf die Kompartimentierung

der Hexokinase

Die Hexokinase des Gehirns von Säugetieren liegt in der Zelle überwiegend an Mitochondrien gebunden vor. Das Enzym kann zum Teil mit G-6-P spezifisch von der Membran abgelöst werden, dieser Effekt ist durch Mg^{2+} reversibel (Wilson, 1967). Auch die Hirn-HK niederer Wirbeltiere ist zum großen Teil partikelgebunden (Wegener und Pfeifer, 1975). Im Gegensatz dazu ist HK aus dem Flugmuskel (Kerly und Leaback, 1957) und dem Gehirn von Locusta (Wegener und Pfeifer, 1975) vollständig im Cytoplasma gelöst.

Es sollte nun versucht werden, zwei Fragen zu beantworten:

1. Ist die fehlende Bindung der Insektenhexokinase auf Eigenschaften des Enzyms oder der Mitochondrien zurückzuführen?
2. Kann HK des Froschirns durch G-6-P eluiert und durch Mg^{2+} wieder angekoppelt werden?

Die cytosolischen Extrakte und die Mitochondrien der Tiere wurden wie unter Material und Methoden beschrieben isoliert.

Im Maushirn waren im Durchschnitt 61 % der HK des Überstandes nach Zentrifugation bei 1000 g an Partikel gebunden und beim Frosch 37 %. Das Enzym der Heuschrecke liegt dagegen vollständig im 10 000 g-Überstand vor (Tab. 5).

Tabelle 5 Verteilung der Hexokinaseaktivität von Maus, Frosch und
Heuschrecke auf Überstand und Sediment nach Zentrifugation
bei 10 000 g

Die Aktivität des Enzyms nach Zentrifugation bei 1000 g wurde gleich
100 % gesetzt. Sie betrug im Mittel:

Maus	7,83 U/g FG
Frosch	8,10 U/g FG
Heuschrecke	4,85 U/FG

	Maus	Frosch	Heuschrecke
Sediment	60,6 ± 4,6 %	37,3 ± 5,1 %	0 %
Überstand	39,4 ± 4,6 %	62,7 ± 5,1 %	100 ± 0 %

Die Mitochondriensuspensionen wurden zur Elution der HK mit 1 mM G-6-P 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde 20 min mit 10 000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand zwei Stunden gegen das Homogenisationsmedium dialysiert. Die Hexokinaseaktivitäten im Überstand und im Sediment wurden bestimmt. Im Mittel ließen sich 31 % der Aktivität der Maus und 23 % beim Frosch durch 1 mM G-6-P lösen (Tab. 6).

Bei den Kontrollwerten (Inkubation ohne G-6-P) waren nur 3 bzw. 2 % der HK im Überstand nachzuweisen. Um das eluierte Enzym des Maushirns wieder an die Membran zu binden, wurde das Dialysat mit den Mitochondrien und 10 mM $MgCl_2$ (der Puffer enthielt 5 mM EDTA) 15 min bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem vorsichtigem Umrühren inkubiert. Dann wurde 20 min bei 10 000 g und 4°C zentrifugiert und die Aktivität in Überstand und Sediment gemessen.

Der gleiche Versuch wurde mit dem Froschenzym durchgeführt. Da Heuschreckenmitochondrien keine HK gebunden hatten, wurde hier cytosolischer Extrakt für die Untersuchung der Anbindung an Mitochondrien durch Mg^{2+} eingesetzt. Parallel dazu wurden noch inkubiert:

HK aus Maushirn mit Mitochondrien von Frosch und Heuschrecke und

HK von Frosch und Heuschrecke mit den Mitochondrien der Maus.

Die Ergebnisse sind in den Tab. 7 und 8 zusammengefaßt.

Maushirnhexokinase wurde unter dem Einfluß von Mg^{2+} nicht nur an die eigenen, sondern auch an die Mitochondrien der Heuschrecke gebunden (Tab. 7). Das Insektenenzym konnte dagegen nicht an die Säugermitochondrien gekoppelt werden.

Tabelle 6 Ablösung der Hexokinase des Maus- und Froschhirns von den Mitochondrien durch 1 mM Glukose-6-phosphat

Die Mitochondrienfraktion mit dem partikulären Enzym wurde mit 1 mM Glukose-6-phosphat 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 g zentrifugiert, der Überstand 2 h gegen Homogenisationsmedium dialysiert und die Aktivität in beiden Fraktionen gemessen. Sie ist angegeben in % der Gesamtkativität:

	Maus	Frosch
Mitochondrienfraktion	68,9 ± 1,9	77 ± 10
Überstand (durch G-6-P eluierte Aktivität)	31,1 ± 1,9	23 ± 10

In Kontrollansätzen ohne Glukose-6-phosphat waren durchschnittlich 3 % (Maus) bzw. 2 % (Frosch) der Aktivität im Überstand zu finden.

Neben der HK aus Maushirn ließ sich auch das Enzym des Frosches durch Mg^{2+} an die Säugermitchondrien binden. Wenn die Hexokinasen beider Tiere mit Froschmitchondrien inkubiert wurden, nahm die Aktivität im Überstand und im Sediment ab, der Wiederfund lag teilweise unter 50 % (Tab. 8).

Tabelle 7 Einfluß von Mg^{++} auf die Anbindung der Hexokinase aus Maus- und Heuschreckenhirn an Mitochondrien

Hexokinase aus Maushirn, die durch 1 mM G-6-P von den Mitochondrien gelöst worden war, und Heuschreckenenzym aus dem Überstand nach Zentrifugation bei 10 000 g wurden mit Mitochondrien und 10 mM $MgCl_2$ 15 min inkubiert. Dann wurde bei 10 000 g 20 min zentrifugiert und im Überstand und Sediment die Aktivität gemessen. Sie ist jeweils in % der gesamten Aktivität vor der Inkubation angegeben (Mittelwert aus 4 Messungen). Das Säugerenzym bindet sowohl an Maus- als an Heuschreckenmitochondrien, Heuschreckenhexokinase konnte dagegen nicht angekoppelt werden.

- 59 -

HK-Aktivität

vor nach Anbindung
mit Mg^{2+}

Maushirn-HK + Mausmitochondrien	Überstand	27,7	10,4
	Sediment	72,3	80,2
Maushirn-HK + Heuschreckenmitochondrien	Überstand	100,0	38,3
	Sediment	0	41,0
Heuschreckenhirn-HK + Mausmitochondrien	Überstand	49,0	50,7
	Sediment	51,0	36,3
Heuschreckenhirn-HK + Heuschreckenmitochondrien	Überstand	100,0	88,5
	Sediment	0	0

Tabelle 8 Anbindung der Hexokinase aus Maus- und Froschhirn an Mitochondrien durch Mg^{2+} .

Die Hexokinase der beiden Tiere, die durch 1 mM Glukose-6-phosphat von den Mitochondrien eluiert worden war, wurde mit Mitochondrien und 10 mM $MgCl_2$ 15 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10 000 g wurde in Überstand und Sediment die Aktivität gemessen. Sie ist in % der gesamten Aktivität vor der Inkubation angegeben (Mittelwert aus 3 Messungen). Die Enzyme von Säuger und Amphibien werden unter Einfluß von Mg^{2+} an Maushirnmitochondrien gebunden.

	HK-Aktivität	
	vor	nach Anbindung mit Mg^{2+}
Maushirn-HK + Mausmitochondrien	Überstand	27,7
	Sediment	10,4
Maushirn-HK + Froschmitochondrien	Überstand	72,3
	Sediment	80,2
Froschhirn-HK + Mausmitochondrien	Überstand	21,0
	Sediment	4,3
Froschhirn-HK + Froschmitochondrien	Überstand	79,0
	Sediment	71,3
Froschhirn-HK + Mausmitochondrien	Überstand	33,0
	Sediment	4,5
Froschhirn-HK + Froschmitochondrien	Überstand	67,0
	Sediment	74,5
Froschhirn-HK + Froschmitochondrien	Überstand	26,0
	Sediment	1,0
Froschhirn-HK + Froschmitochondrien	Überstand	74,0
	Sediment	47,0

D Diskussion

Wegen der zentralen Stellung des Enzyms im Glukosestoffwechsel wurden die Molekülstruktur, der Reaktionsmechanismus und die regulatorischen Eigenschaften der Säugerhirnhexokinase in den letzten Jahren mit verschiedenen Methoden intensiv untersucht. Ausgehend von den Ergebnissen wurden Hypothesen und Modelle zur Katalyse und Regulation der HK aufgestellt, die noch umstritten sind und sich zum Teil widersprechen (s. Einleitung). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, mit Hilfe der Affinitätschromatographie an immobilisiertem ATP weitere Informationen über die Reaktions- und Regulationsmechanismen von Säugerenzym und im Vergleich dazu von Hexokinasen niederer Tiere zu erhalten. Es wurden dafür zwei verschiedene Gele verwandt, bei denen das Substrat ATP als Ligand einmal über die oxidierte Ribose, im anderen Fall über den Adeninring an die Agarose-Matrix gekoppelt war.

Maushirn-HK

Eine wichtige Rolle bei der Regulation von Hirn-HK der Mammalia spielt das Produkt Glukose-6-phosphat. Bis heute ist aber nicht geklärt, ob die starke Hemmung des Enzyms durch einen Angriff des Inhibitors im katalytischen oder einem eigenen regulatorischen Zentrum zustande kommt. Die affinitätschromatographischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, daß G-6-P Hexokinase vollständig (Gel I) oder zum größten Teil (Gel II) vom Liganden ablöst. Eine langsamere ablaufende Elution war aber auch mit Mannose-6-phosphat möglich. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden von Casazza und Fromm (1976), daß M-6-P den gleichen Inhibitionsmechanismus zeigt wie G-6-P, nur mit einem we-

sentlich höheren K_i -Wert. Auch der Schutz der HK vor Inaktivierung mit Glutaraldehyd ist durch beide Zuckerphosphate möglich (Wilson, 1978), bei M-6-P allerdings nicht so wirkungsvoll und erst durch höhere Konzentrationen. Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie lassen sich so auch gut durch das Modell von Wilson (1978, 1979) erklären, das dieser nach seinen eigenen und den Untersuchungen von Casazza und Fromm aus einer Hypothese von Ellison et al. (1975) entwickelte.

Danach wird G-6-P mit dem Zuckerrest von der katalytischen auf eine überlappende regulatorische Bindungsstelle übertragen, und dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung (s. Einleitung). Sie könnte für die Ablösung der HK von den Liganden verantwortlich sein. M-6-P und 2-Desoxyglukose-6-phosphat bewirken die Konformationsänderung und somit die Elution dagegen nicht so leicht. Durch 1 mM Glukose-6-phosphat konnte die HK nicht vollständig von Gel II eluiert werden. Die Ursache dafür ist nicht klar. Eine Möglichkeit ist, daß der Zugang des Inhibitors zum Enzymmolekül durch die Modifikation und Immobilisierung des Liganden behindert wird. Aber durch 1 mM ATP⁴⁻ wurde ebenso wie mit den Zuckerphosphaten weniger HK von Gel II eluiert. Dies deutet darauf hin, daß die Bindung an das ATP, welches über N⁶ des Adeninringes und einen Spacer an die Matrix gekoppelt wurde, fester war als die an den Liganden von Gel I.

Lindberg und Mosbach (1975) wiesen für lösliches N⁶ - [(6-Aminohexyl)carbamoyl-methyl-] ATP, dem Liganden-Spacer-Komplex von Gel II bereits nach, daß er ein gutes Substrat der Hefehexokinase ist. Und Hohnadel und Cooper (1972) zeigten, ebenfalls für das Enzym der Hefe, daß sich die Affinität von ATP durch Modifikationen an der Base und dem Zucker ändern läßt.

Redkar und Kenkare (1972) fanden, daß Glukose im Gegensatz zu $MgATP^{2-}$ Hirnhexokinase vor der Inaktivierung durch Ellman's Reagenz schützt. Colowick (1973) schloß daraus, daß die Reaktion des Enzyms wahrscheinlich über die Bildung des Enzym-Glukose-Komplexes und anschließende Bindung von ATP abläuft (ordered sequential mechanism). Die Arbeitsgruppe um Fromm (Ning et al. 1969; Purich und Fromm, 1971) forderte aus ihren kinetischen Daten dagegen eine zufällige Reihenfolge der konsekutiven Bindung der beiden Substrate (random sequential mechanism).

Bei der Affinitätschromatographie war eine Bindung der HK an ATP-Sepharose ohne Glukose nicht möglich. Dies spricht dafür, daß durch die Bindung der Hexose eine Konformationsänderung des Enzyms induziert wird. Aus den Ergebnissen von Redkar und Kenkare und seinen eigenen Untersuchungen, nach denen Glukose die Hexokinase vor Inaktivierung durch Glutaraldehyd und Chymotrypsin schützte, schloß auch Wilson (1978), daß die Bildung des Enzym-Glukose-Komplexes zu einer Konformationsänderung führt. Eine zufällige Reihenfolge der Bindung der beiden Substrate (random sequential mechanism) erscheint dann aber unwahrscheinlich, da ATP in diesem Fall im katalytischen Zentrum gleich gut an zwei verschiedene Konformationen der HK binden müßte.

Um einen Vergleich der Eigenschaften von Isoenzym I aus Hirn mit anderen Isoenzymen der Maus zu haben, wurden Chromatographien von Mausmuskel, der vorwiegend HK II enthält, an Gel I und II durchgeführt. Die Bindung war im ersten Fall geringer, aber die Elution durch G-6-P die gleiche wie bei dem Hirnenzym. Es gab in diesen Experimenten keinen Hinweis auf einen unterschiedlichen Angriff des Inhibitors am Enzymmolekül.

Froschhirn-HK

Die Hexokinase des Froschhirns wurde vollständig an beide Gele gebunden. Für die Adsorption war, anders als bei der Maus, keine Glukose nötig. Dies deutet auf einen unterschiedlichen katalytischen Mechanismus bei beiden Tieren hin, denn eine obligate Reihenfolge der Substratbindung über den Enzym-Glukose-Komplex (ordered sequential mechanism über den Enzym-Glukose-Komplex) kann für das Froschenzym ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie geben auch keinen Hinweis darauf, daß die Bindung der Glukose eine Konformationsänderung der Froschhirnhexokinase, wie sie bei dem Mausenzym wahrscheinlich ist, bewirkt.

Die Ablösung der Froschhirnhexokinase von den Gelen war weder durch 1 mM und 5 mM G-6-P, noch mit 1 mM M-6-P oder 2-DG-6-P möglich. Dagegen wurde das Enzym durch 1 mM MgATP^{2-} und etwas geringer durch 1 mM ATP^{4-} eluiert. Da Froschhirnhexokinase bei einer Konzentration von 1 mM G-6-P wie das Enzym der Maus fast vollständig inhibiert wird, könnte die fehlende Wirkung des Inhibitors auf die Bindung durch einen anderen Hemmungsmechanismus erklärt werden. So wäre bei der Maus ein Angriff von G-6-P an einem allosterischen Bindungsort -der dabei den katalytischen überlappen kann, wie Ellison et al. und Wilson glauben - denkbar. Die Inhibition des Froschenzyms könnte dagegen einfache Produkthemmung sein, die keine Konformationsänderung der HK bewirkt, um das gebundene Enzym von den Gelen zu eluieren.

HK aus dem Nervengewebe von Heuschrecke und Schnecke

Die Hexokinase der Ganglien von Heuschrecke und Schnecke zeigten in ihren Eigenschaften bei der Affinitätschromatographie große Übereinstimmung. So war die Adsorption des Enzyms - wie beim Frosch - unabhängig von Glukose.

Weiterhin wurde jeweils nur ein Teil der aufgetragenen Aktivität an den Liganden gebunden. Das legte die Vermutung nahe, daß im Gehirn der beiden Wirbellosen mindestens zwei Isoenzyme der HK vorliegen (s. unten). Während der Anteil gebundenen Enzyms bei geringer Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von 80 mM KCl stark reduziert wurde, ließen sich die Hexokinasen kaum spezifisch ablösen. So hatten MgATP^{2-} und ATP^{4-} bei beiden Enzymen nur eine schwache Wirkung auf die Bindung, es wurden bei den verwendeten Elutionsvolumina nie mehr als 15 % der Aktivität eluiert. Die Affinität der gebundenen Hexokinasen der Evertetraten zum Liganden ist im Vergleich zum löslichen Substrat offensichtlich höher als bei Maus und Frosch.

Die Ergebnisse der Elution durch Glukose-6-phosphat glichen dagegen denen mit Froschirnhexokinase. Durch 1 mM G-6-P war eine Elution des Schneckenenzym von den Gelen nicht möglich. Bei der Heuschrecke wurde nur von Gel I ein kleiner Teil der gebundenen Aktivität abgelöst. Da aber 1 mM G-6-P die Aktivität der Evertetratenhexokinasen zu über 90 % hemmt, könnte hier ein ähnlicher Inhibitionsmechanismus vorliegen wie beim Frosch. Die Vermutung, daß die HK von Heuschrecke und Schnecke in den Ganglien in Isoenzymen mit unterschiedlicher Affinität zu den Liganden vorliegt, wurde durch die Bestimmung des Verhältnisses $V_{\max}$ Fruktose : $V_{\max}$ Glukose bestätigt: der Wert für den nicht gebundenen Anteil der Enzyme war höher als für den gebundenen.

Nach der Polyacrylamidelektrophorese des cytosolischen Schneckenhirnextrakts färbten sich drei Aktivitätsbanden der HK, wahrscheinlich Isoenzyme. Sie konnten in der Fraktion I der Affinitätschromatographie ebenfalls nachgewiesen werden, dagegen zeigte die zweite Fraktion nur eine Bande.

Daß auch dieses Isoenzym nicht vollständig an ATP-Agarose adsorbiert wurde, stimmt mit der Beobachtung überein, daß der gebundene Anteil der HK bei Schnecken relativ gering war.

Die Aktivität im cytosolischen Extrakt des Heuschreckenhirnes färbte zwei Banden, die sich nicht sicher auftrennen ließen. Die Laufstrecken der Banden der beiden Chromatographiepeaks unterschieden sich aber deutlich. Dies bestätigte die Ergebnisse der Affinitätschromatographie und der Bestimmung des Quotienten $V_{\max} \text{ Fruktose} : V_{\max} \text{ Glukose}$ der HK, nach denen im Cerebralganglion der Heuschrecke zwei Isoenzyme vorliegen. Dabei ist bemerkenswert, daß durch die Affinitätschromatographie eine bessere Auftrennung der Heuschreckenisoenzyme erreicht wurde als mit der Polyacrylamidgelelektrophorese.

Sowohl bei *Helix* als auch bei *Locusta* war in der Elektrophorese die Bande der HK, die an ATP-Agarose gebunden hatte, breiter und nicht so scharf wie die des ungebundenen Enzyms, obwohl sie weniger verunreinigt sein mußte. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf die unterschiedlichen Bedingungen bei der Elektrophorese zurückzuführen, denn die Fraktion II der Aktivität wurde wegen der Elution von ATP-Agarose in einem Puffer von wesentlich höherer Ionenstärke (1M KCl) auf die Gele aufgetragen.

In einer neueren Untersuchung wies Yanagawa (1978) ebenfalls durch Elektrophorese und Bestimmung des Verhältnisses $V_{\text{Fruktose}} : V_{\text{Glukose}}$ (bei 3,3 mM Substrat) im Mitteldarm von Seidenspinnerlarven Isoenzyme nach, die er auf einer DEAE-Cellulose-Säule getrennt hatte.

Die unterschiedliche Affinität von Heuschreckenisoenzymen an ATP-Agarose zeigt auch ein Vergleich der Hirnhexokinase mit der aus Flugmuskulatur, die nicht an ATP-Sepharose (Gel I) gebunden wurde (C. Stich, 1977).

Intrazelluläre Lokalisation von Hirn-HK

Die HK von Wirbeltieren liegt in der Zelle zum Teil an Mitochondrien gebunden vor, eine Eigenschaft, die den bisher daraufhin untersuchten Evertibratenenzymen fehlt (Wegener und Pfeifer, 1975; V. Stich, 1975). Mit G-6-P ist eine spezifische Elution der Hexokinase von den Membranen der Organellen möglich, durch Mg^{2+} wird das Enzym dann wieder angebunden (Wilson, 1967). In den vorliegenden Untersuchungen konnten die Hexokinasen von Maus und Frosch an Säugermitchondrien und Maushexokinase auch an Heuschreckenmitochondrien gekoppelt werden, das Enzym von Locusta dagegen nicht an die Membranen der Säugerpartikel. Die Struktur der Heuschreckenhexokinase ist also zumindest mitverantwortlich dafür, daß es zu keiner Interaktion mit den Mitochondrien kommt.

Andererseits scheint aber die Anbindung des Mausenzym an die Partikel im Gehirn der Heuschrecke unspezifisch zu sein. Felgner et al. (1979) konnten nämlich zeigen, daß für die Kopplung der HK ein bestimmtes Protein in der Mitochondrienmembran mit einem MW von 31 000 verantwortlich sein muß. Wenn ihre Beobachtung stimmt, ist kaum vorstellbar, daß die Membranen der Heuschreckenmitochondrien, die das eigene Enzym nicht zu binden vermögen, ein für die Kopplung der Maushirnhexokinase offensichtlich obligates Protein besitzen sollen.

Nicht geklärt wurde bisher, ob und wie eine Wiederaanbindung von HK an Froschhirnmitochondrien erreicht werden könnte, nachdem sich das Enzym wie die Säugerhexokinase durch G-6-P partiell ablösen ließ. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob Froschhirnmitochondrien ein hexokinasebindendes Membranprotein besitzen.

Das Gleichgewicht der Verteilung von gelöster und partikulärer HK im Gehirn von Säugetieren wird durch verschiedene Metabolite (G-6-P, ATP, P_i) beeinflusst. Das gebundene Enzym, das auch intramitochondrial gebildetes ATP umsetzen kann (Inui und Ishibashi, 1979) hat einen kleineren K_M -Wert für dieses Substrat und wird außerdem durch G-6-P nicht so stark inhibiert (Wilson, 1967). Die Bindungsfähigkeit der HK an die Mitochondrien scheint so eine Möglichkeit der Enzymregulation darzustellen, die den Insekten und auch der Hefe fehlt.

Die Hexokinasen der bisher untersuchten Insektenarten zeigten neben der fehlenden Mitochondrienbindung noch eine weitere Übereinstimmung mit dem Hefeenzym, ihr MW liegt etwa bei 45 000 - 50 000 D (Säugerhexokinase 96 000 D) (Yanagawa 1978; Moser et al., 1980). Im Gegensatz zu sämtlichen tierischen Hexokinasen wurde aber das Enzym von *Saccharomyces cerevisiae* überhaupt nicht an ATP-Agarose gebunden. Dies spricht dagegen, daß sich Hefehexokinase und die adsorbierten Isoenzyme der beiden Vertebraten in der Konformation des katalytischen Zentrums gleichen.

Die Hexokinase der Tiere, die in dieser Arbeit untersucht wurden, unterschieden sich bei der Affinitätschromatographie an den ATP-Agarose-Gelen in ihrer Affinität zu den Liganden und löslichen Substraten und Effektoren. Daraus muß man auf unterschiedliche Strukturen der Bindungszentren schließen, die nach den Ergebnissen der Chromatographie teilweise verschiedene Katalyse- und Regulationsmechanismen der Enzyme (z. B. Reihenfolge der Substratbindung, Angriffsort der G-6-P-Inhibition an den HK) zur Folge haben.

Nur die Enzyme aus den Nervengewebe von Heuschrecke und Schnecke verhielten sich bei der Affinitätschromatographie wie auch bei den Messungen von ($V_{\max}$ Fruktose) : ($V_{\max}$ Glukose) sehr ähnlich, obwohl die beiden Tiere phylogenetisch weit voneinander getrennt sind und bei den Wirbellosen Hexokinasen mit völlig differenten Eigenschaften gefunden wurden (s. Einleitung). Sehr interessant wäre in diesem Zusammenhang ein Vergleich der Muskelhexokinase von Schnecke und Heuschrecke, weil sich die unterschiedliche Lebensweise der Tiere in diesem Organ stärker auswirken müßte als im Gehirn.

Affinitätschromatographie als Verfahren zur Charakterisierung von Enzymen -----

Die Affinitätschromatographie wurde bisher als eine Methode angesehen, mit der Biomoleküle durch selektive Bindung und Elution angereichert werden können, wobei wesentlich geringere Gewebemengen als bei unspezifischeren Verfahren benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, daß die Methode darüberhinaus wichtige Informationen über Katalyse- und Regulationsmechanismen und über Strukturunterschiede der Enzyme verschiedener Herkunft geben kann. Bei der Auftrennung von Isoenzymen der Heuschreckenhirnhexokinase erwies sie sich sogar der klassischen Methode der Gelelektrophorese überlegen. Die Affinitätschromatographie stellt so eine wertvolle Ergänzung anderer Methoden zur Charakterisierung von Enzymproteinen, wie Enzymkinetik, Elektrophorese und Immunologie, dar.

E Zusammenfassung

- 1.) Es wurden vergleichende affinitätschromatographische Untersuchungen von Hexokinasen aus dem Gehirn von Maus, Frosch, Heuschrecke und Schnecke an zwei ATP-Agarose-Gelen durchgeführt. Bei Gel I war der Ligand über den oxidierten Riboserest und einen Spacer an die Matrix gebunden, bei Gel II über den Adeninring.
- 2.) Das Enzym des Maushirns wurde an beiden Gelen praktisch vollständig und spezifisch gebunden, Pyruvatkinase an Gel I zu weniger als 10 % und Adenylatkinase überhaupt nicht.
- 3.) Durch 1 mM G-6-P konnte die HK von Gel I vollständig, von Gel II zum größten Teil eluiert werden. Eine langsamere Ablösung des Enzyms wurde auch mit 1 mM M-6-P von beiden Liganden und mit 2-DOG-6-P von Gel I erreicht. ATP⁴⁻ eluierte HK von Gel I zu über 95 % und von Gel II zu 60 %.
- 4.) HK aus Mausmuskel, der vorwiegend Isoenzym II enthält, verhielt sich bei der Elution durch G-6-P wie das Isoenzym I aus Hirngewebe. Allerdings wurden an ATP-Sephrose (Gel I) nur 60 % des aufgetragenen Enzyms adsorbiert.
- 5.) Froschhirnhexokinase wurde im Gegensatz zu Pyruvatkinase vollständig an beide Gele gebunden. Die Adsorption war nicht davon abhängig, daß Glukose in den Chromatographiepuffer gegeben wurde. Mit 1 und 5 mM G-6-P, 1 mM M-6-P und 1 mM 2-DOG-6-P konnte das Enzym nicht eluiert werden. 1 mM MgATP²⁻ löste die HK dagegen vollständig ab.

- 6.) Die Hexokinasen von Heuschrecke und Schnecke erschienen nach der Chromatographie in zwei Fraktionen im Eluat, von denen eine an das Gel gebunden und durch hohe Ionenstärke abgelöst wurde. Die Bindung dieser Enzymaktivität war nicht abhängig davon, daß der Puffer Glukose enthielt.

Mit 1 mM G-6-P konnte lediglich bei der Heuschrecke und auch nur von ATP-Sepharose (Gel I) ein Teil der HK eluiert werden. ATP^{4-} , MgATP^{2-} und Mg^{2+} hatten in allen Fällen nur einen schwachen Effekt auf die Bindung ($< 15\%$ der Aktivität mit 3 ml Puffer abgelöst).

Die Affinität der Pyruvatkinase zu den Liganden war bei den Evertebraten gering, es wurden jeweils weniger als 10 % adsorbiert.

- 7.) Hefehexokinase, die im Vergleich zu den tierischen Enzymen untersucht wurde, konnte an ATP-Agarose (Gel II) nicht gebunden werden, die Aktivität wurde nicht in Isoenzyme aufgetrennt wie an Gel I (Werner, 1977).
- 8.) Während 1 mM G-6-P unterschiedliche Effekte auf die Bindung der untersuchten Hexokinasen an die ATP-Agarosen hatte, wurden alle vier Enzyme bei dieser Konzentration zu mehr als 90 % inhibiert.
- 9.) Die beiden Fraktionen der HK-Aktivität aus der Affinitätschromatographie von Heuschrecken- und Schneckenhirnextrakt unterschieden sich im Verhältnis $V_{\max} \text{ Fruktose} : V_{\max} \text{ Glukose}$. Der Wert für das nicht gebundene Enzym war jeweils größer als der des gebundenen.

- 10.) Mit cytosolischen Extrakten von Heuschrecken- und Schneckenhirn und deren beiden Fraktionen aus der Affinitätschromatographie an Gel II wurde eine Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

Bei *Helix* zeigten das Cytosol und das nicht an ATP-Agarose gebundene Enzym drei, der gebundene Anteil der HK dagegen nur eine Aktivitätsbande. Cytosolischer Heuschreckenextrakt färbte zwei nicht vollständige getrennte Banden, die Aktivitäten der beiden Chromatographiefraktionen liefen aber in der Elektrophorese unterschiedlich weit.

- 11.) Froschhirnhexokinase ist wie das Enzym der Maus in der Zelle zum Teil an Mitochondrien gebunden und konnte wie dieses durch 1 mM G-6-P partiell abgelöst werden.

Die solubilisierete HK des Maushirns wurde mit Mg^{2+} an die Mitochondrien von Maus und Heuschrecke, deren Enzym nicht an Partikel gebunden ist, gekoppelt.

Die HK des Frosches wurde durch das divalente Kation an Säugermitchondrien gebunden.

Die Ergebnisse werden mit denen der Literatur verglichen und vor allem im Hinblick auf die Regulation tierischer Hexokinasen diskutiert. Dabei zeigt sich, daß es mit Hilfe der Affinitätschromatographie möglich ist, Unterschiede in der Katalyse und Regulation von Hexokinasen verschiedener Herkunft festzustellen.

F Literaturverzeichnis

- BENDE, H.: Affinitätschromatographie. Chemie in unserer Zeit, 8, 17-25 (1974).
- CASAZZA, J.P. and FROMM, H.J.: Studies on the Mode of Sugar-Phosphate Product Inhibition of Brain Hexokinase. Arch. Biochem. Biophys. 177, 480-487 (1976).
- CHENG, M.L. and HACKER, C.S.: The Genetics of Hexokinase in a Mosquito, *Culex pipiens*. Genetics 92, 903-913 (1979).
- COLOWICK, S.P.: The Hexokinase, in: The Enzymes, Boyer, P.D. (Ed.), Vol. IX B, 3rd Ed., Acad. Press N.Y., London (1973).
- CRANE, R.K. and SOLS, A.: The Association of Hexokinase with Particulate Fractions of Brain and Other Tissue Homogenates. J. Biol. Chem. 203, 273-292 (1953).
- DOMANSKA-JANIK, K., BRONISZEWSKA-ARDELT, B., WROBLEWSKI, J.T.: Effect of Fatty Acids on Rat Brain Particulate Hexokinase. J. Neurochem. 30, 1157-1162 (1978).
- ELLISON, W.R., LUECK, J.D. and FROMM, H.J.: Studies on the Mechanism of Orthophosphate Regulation of Bovine Brain Hexokinase. J. Biol. Chem. 250, 1864-1871 (1975).
- FELGNER, P.L., MESSER, J.L. and WILSON, J.E.: Purification of a Hexokinase Binding Protein from the Outer Mitochondrial Membrane. J. Biol. Chem. 254, 4946-4949 (1979).

- HANKE, J., HOEFELER, H., KRIEGELSTEIN, S., WEVER, K.: Influence of Various Lipophilic Drugs on Brain Mitochondrial Hexokinase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 171-176 (1979).
- HARRISON, R.A.P.: The Detection of Hexokinase, Glucose-phosphate-Isomerase and Phosphoglucomutase Activities in Polyacrylamide Gels after Electrophoresis: A Novel Method Using Immobilized Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Anal. Biochem. 61, 500-507 (1974).
- HOHNADÉL, D.C. and COOPER, C.: The Effect of Structural Modifications on the Yeast Hexokinase Reaction. Eur. J. Biochem. 31, 180-185 (1972).
- HUTCHISON, W.F., TURNER, A.C. and OEHLSCHLEGEL jr., F.J.: Hexokinase of the Adult Dog Heartworm, *Dirofilaria immitis*. Comp. Biochem. Phys. 58 B, 131-134 (1977).
- IGNATYUK, T.E.: The Dynamics of Hexokinase Activity Changes in the Subcellular Tissue Fractions of Newborn Rats during Hypoxia. Byull. Eksp. Biol. Med. 83, 21-24 (1977).
- JACOBY, W.B. and WILCHEK, M.: Affinity Techniques, in: Methods in Enzymology, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds.), Vol. XXXIV B, Acad. Press, N.Y., London (1974).

- KATZEN, H.M.: The Multiple Forms of Mammalian Hexokinase and Their Significance to the Action of Insulin. *Advanc. Enzyme Regulation* 5, 335-356 (1967).
- KERLY, M. and LEABACK, D.H.: The Characteristics of Hexokinase from *Locusta migratoria* Muscle. *Biochem. J.* 67, 245-250 (1957).
- KROPP, E.S. and WILSON, J.E.: Hexokinase Binding Sites on Mitochondrial Membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 38, 74-79 (1970).
- LAMED, R., LEVIN, Y. and OPLATKA, A.: Enzymatic Mechanochemistry: I. The Interaction of Heavy Meromyosin with 'Immobilized Adenosine Triphosphate'. *Biochem. Biophys. Acta* 305, 163-171 (1973).
- LINDBERG, M. and MOSBACH, K.: Preparation of Analogues of ATP, ADP and AMP Suitable for Binding to Matrices and the Enzymic Interconversion of ATP and ADP in Solid Phase. *Eur. J. Biochem.* 53, 481-486 (1975).
- MOCHIZUKI, Y. and HORI, S.H.: Purification and Properties of Hexokinase from the Starfish *Asterias amurensis*. *J. Biochem. (Tokyo)* 81, 1849-1856 (1977).

- MOSER, D., JOHNSON, L. and LEE, C.Y.: Multiple Forms of *Drosophila* Hexokinase. Purification, Biochemical and Immunological Characterization. J. Biol. Chem. 255, 4673-4679 (1980).
- NING, J., PURICH, D.L. and FROMM, H.J.: Studies on the Kinetic Mechanism and Allosteric Nature of Bovine Brain Hexokinase. J. Biol. Chem. 244, 3840-3846 (1969).
- OGUCHI, M., KANDA, T. and AKAMATSU, N.: Hexokinase of *Angiostrongylus cantonensis*: Presence of a Glucokinase. Comp. Biochem. Physiol. 63 B, 335-340 (1979).
- PURICH, D.L. and FROMM, H.J.: The Kinetics and Regulation of Rat Brain Hexokinase. J. Biol. Chem. 246, 3456-3463 (1971).
- REDKAR, V.D. and KENKARE, U.W.: Bovine Brain Mitochondrial Hexokinase: Solubilization, Purification, and Role of Sulfhydryl Residues. J. Biol. Chem. 247, 7576-7584 (1972).
- ROSE, I.A. and WARMS, J.V.B.: Mitochondrial Hexokinase - Release, Rebinding, and Location. J. Biol. Chem. 242, 1635-1645 (1967).

- ROTH-SCHECHTER, B.F., WINTERITH, H., THOLEY, G.,
DIERICH, A., MANDEL, P.: Effect of Pentobarbital on Mitochondrial Synthesis in Cultured Glial Cells. *J. Neurochem.* 33, 669-676 (1979).
- SCHWARTZ, G.P. and BASFORD, R.E.: The Isolation and Purification of Solubilized Hexokinase from Bovine Brain. *Biochemistry* 6, 1070-1079 (1967).
- STICH, C.: Affinitätschromatographische Untersuchungen an tierischen Hexokinasen. Wissenschaftliche Zulassungsarbeit für das Lehramt an Gymnasien, Universität Heidelberg (1977).
- STICH, V.: Vergleichende Untersuchungen an tierischen Hexokinasen. Wissenschaftliche Zulassungsarbeit für das Lehramt an Gymnasien, Universität Heidelberg (1975).
- TABACHNIK, W.J.: Identification and Linkage Relationships of Three Hexokinase Genes in *Aedes aegypti*. *Biochem. Genetics* 16, 571-575 (1978).
- WARBURG, O. und CHRISTIAN, W.: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridin-Nukleotide). *Biochem. Z.* 287, 291-328 (1936).
- WEGENER, G. und PFEIFER, J.: Besonderheiten der Stoffwechselorganisation in den Hirnen von Vertebraten und Evertrebraten. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 1974, 266-271 (1975).

- WEIL-MALHERBE, H. and BONE, A.D.: Studies on Hexokinase.
1. The Hexokinase Activity of Rat Brain
Extracts. *Biochem. J.* 49, 339-347 (1951).
- WERNER, M.: Affinitätschromatographische Untersuchun-
gen von Hexokinasen aus Maushirn und Hefe.
Diplomarbeit, Universität Mainz (1977).
- WERNER, M. and WEGENER, G.: Hexokinase from Mouse Brain
Studied by Affinity Systems. Abstr.
FEBS Special Meeting on Enzymes, S 1-29
(1979).
- WILSON, J.E.: The Latent Hexokinase Acitivity of Rat
Brain Mitochondria. *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. 28, 123-127 (1967).
- WILSON, J.E.: Ligand-Induced Conformations of Rat
Brain Hexokinase: Effects of Glucose-
6-Phosphate and P_i . *Arch. Biochem. Bio-*
phys. 159, 543-549 (1973).
- WILSON, J.E.: Ligand-Induced Conformations of Rat
Brain Hexokinase: Studies with Hexoses,
Hexose-6-Phosphates, and Nucleoside
Triphosphates Leading to Development of
a New Model for the Enzyme. *Arch.*
Biochem. Biophys. 185, 88-99 (1978).
- WILSON, J.E.: Ligand-Induced Conformational Changes of
Rat Brain Hexokinase: Their Role in De-
termining the Substrate Specifity for Hex-
oses and Inhibitory Effectiveness of
Hexose-6-Phosphates. *Arch. Biochem.*
Biophys. 196, 79-87 (1979).

YANAGAWA, H.-A.: Tissue Distribution, Purifications
and Properties of Multiple Forms of
Hexokinase in the Silkworm, *Bombyx mori*.
Insect. Biochem. 8, 293-305 (1978).

Lebenslauf

Am 24. August 1950 in Frankfurt a. M. geboren,
1957 Einschulung in Sorge/Kr. Bad Hersfeld, 1959 Wechsel
zur Eisgrubschule in Mainz,
ab 1961 Besuch des Gutenberg-Gymnasiums in Mainz bis zum
Abitur im Juni 1969.

Nach dem Wehrdienst Immatrikulation im SS 1971 an der
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz im Fach Biologie,
seit WS 1976 Studium der Medizin in Mainz,
Diplom-Hauptprüfung in Biologie am 18. Oktober 1977, danach
Beginn der Bearbeitung des vorliegenden Themas,
Physikum in Medizin im März 1978, I. Staatsexamen im
März 1979.

